



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Influência da época de colheita e estado fenológico na composição fenólica e propriedades bioativas de infusões de tomilho-limão, hortelã-vulgar, limonete e erva-príncipe

Íngride Ariana de Oliveira Rita

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança
e à Universidade de Salamanca para obtenção do
Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais*

Orientado por

Isabel C.F.R. Ferreira

Lillian Barros

Bragança

Outubro de 2017

Este trabalho foi financiado pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal através do projeto 0377_Iberphenol_6_E.



AGRADECIMENTOS

São tantos aqueles que contribuíram para a concretização deste projeto, que é difícil menciona-los a todos, no entanto deixo desde já os meus mais sinceros agradecimentos aos que participaram direta ou indiretamente na realização desta tese. E a esses dedico esta dissertação.

A execução deste trabalho deve-se principalmente à orientação da Doutora Isabel Ferreira e da Doutora Lillian Barros, que sempre me apoiaram desde o início, e por isso só tenho a agradecer a ambas por toda a paciência, ânimo, afeto, respeito e atenção. É notável a dedicação que demonstram pelo trabalho e por toda a equipa que gerem e apesar dos inúmeros compromissos que as rodeiam, sempre se dispõem a auxiliar e orientar no que é preciso. E é por isso e muito mais, que sempre serão uma fonte de inspiração.

Agradeço também às Doutoradas Carla Pereira, Ângela Fernandes, Sandrina Heleno e Inês Dias por me acompanharem neste projeto, por toda a dedicação e carinho que sempre demonstraram, por tudo o que me ensinaram, por toda a paciência que tiveram comigo e por todo o apoio que me deram, estou ciente de que muito deste trabalho se deve a cada uma delas.

Do mesmo modo, agradeço à Andreia Tomás, à Doutora Eliana Pereira e Cristina Caleja, pois apesar de não ter tido a oportunidade de trabalhar diretamente com elas, sempre me receberam com muito carinho e auxiliaram quando necessitei.

Estou muito agradecida ao Doutor Miguel Prieto por me ajudar quando precisei, sem mesmo me conhecer, e por ter feito mais do que lhe pedi.

A toda a equipa da BioChemCore, por serem excelentes em tudo e por estarem sempre dispostos a ajudar aqueles que precisam, por toda a dedicação e empenho que sempre tiveram. Foi para mim um privilégio poder fazer parte desta família.

Ao IPB, em especial à Escola Superior Agrária, e a todos os professores que me acompanharam desde o início do ciclo de estudos, por todos os conhecimentos adquiridos, pelo afeto, e por me motivarem a continuar. Entre eles destaco a Dra. Isabel Ferreira, Dra. Ana Maria Carvalho, Dra. Maria João Sousa, Dr. Miguel Vilas Boas, Dra. Conceição Fernandes, Dr. Manuel Ângelo Rodrigues... São todos pessoas formidáveis que tive o privilégio de conhecer e sei que se hoje cheguei até aqui devo-o a cada um deles. E sempre hei de recordar tudo o que me ensinaram com muito carinho. Um muito obrigada a todos!

À Universidade de Salamanca, ao professor Pablo Garcia e a todo o corpo docente que me acompanhou durante os meses em que lá estive. Esta parceria entre as duas instituições é uma mais-valia para nós estudantes deste mestrado, e por isso agradeço por esta fantástica oportunidade.

Seria impossível não agradecer a toda a minha família, por todo o carinho, motivação e apoio. Aos meus pais Pedro Rita e Liliana Oliveira e ao irmão Rúben Rita por terem acreditado em mim, por me motivarem e apoiarem incondicionalmente. Aos meus avós, Alberto Rita, Cipriana Rita, Manuel de Oliveira e Julieta Oliveira por todo o carinho e apoio, por me ensinarem tanto sobre a vida e serem um exemplo para mim em tudo, e porque sem

eles não teria chegado até aqui. Obrigada família por serem os melhores do mundo, por sempre estarem presentes e unidos, mesmo apesar das dificuldades e momentos difíceis.

Igualmente quero agradecer aos amigos Sr. Marcelo Bezerril, Dna. Marlucia Bezerril e Dna Manuela Mendes e família, por toda a amizade e apoio que sempre demonstraram ao longo deste percurso e por me incentivarem a prosseguir com os meus estudos.

Aos meus senhorios de Bragança Sr. Abílio e Dna. Eliane por todo o carinho com que sempre me trataram, por todo o apoio e amizade. Por me tratarem como se fosse da família. Um muito obrigada!

Àqueles amigos (irmãos) de longa data, Catarina Bouça, Mariana Fernandes e Paulo Pereira pela amizade, apoio e momentos divertidos que sempre proporcionam.

Às minha princesas e companheiras de batalha Catarina Lopes e Cecília Jiménez por serem mais do que amigas para mim, são como irmãs/filhas adotivas, e embora não as conheça há muito tempo, é como se as conhecesse a vida toda. Obrigada por tudo o que vocês me têm ensinado, por todo o carinho e amizade, para mim foi uma honra poder conhecer-vos. Ao Tote (que é o melhor do mundo) por todas as fantásticas viagens proporcionadas. À Joaquina Botas por ser uma excelente *partner* e me motivar a participar em outros projetos. À minha turma por serem excelentes colegas e pelos momentos divertidos proporcionados. À minha querida irmanzinha Catarina Almeida, que embora distante, sempre se fez presente, e por tudo o que aprendi com ela. À minha querida madrinha Méliça Lopes, que apesar da distância estará sempre no meu coração.

E acima de tudo, e ainda que não tenha religião, agradeço a Deus por esta oportunidade, por acordar a cada manhã, por colocar pessoas fantásticas no meu caminho e principalmente, por me dar tudo, mesmo sem nada merecer.



ÍNDICE

ÍNDICE DE FÍGURAS	III
ÍNDICE DE TABELAS	V
ABREVIATURAS	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 CONSUMO	2
1.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MATRIZES ABORDADAS NESTE ESTUDO	3
1.2.1 <i>Aloysia citriodora</i> Gómez Ortega & Palau	3
1.2.2 <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	5
1.2.3 <i>Mentha spicata</i> L.	7
1.2.4 <i>Thymus x citriodorus</i> (Pers.) Schreb.	9
1.3 ANTIOXIDANTES	10
1.3.1 Compostos fenólicos	13
1.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	16
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 SELEÇÃO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	26
3.2 PADRÕES E REAGENTES	26
3.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS.....	26
3.4 ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC-DAD-ESI/MSN.....	27
3.5 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES ATRAVÉS DE MÉTODOS <i>IN VITRO</i>	28
3.5.1 Atividade captadora de radicais DPPH	28
3.5.2 Poder Redutor	28
3.5.3 Inibição da descoloração do β -caroteno.....	29
3.5.4 Inibição da peroxidação lipídica através de produtos reativos do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	30
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 COMPOSTOS FENÓLICOS	34
4.1.1 <i>Mentha spicata</i>	34
4.1.2 <i>Cymbopogon citratus</i>	38
4.1.3 <i>Aloysia citriodora</i>	41
4.1.4 <i>Thymus citriodorus</i>	43
4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	45
CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lotes reserva comercializados pela empresa “cantinho das aromáticas”.....	3
Figura 2. <i>Aloysia citrodora</i> gómez ortega & palau. (a) forma arbustiva, (b) detalhe da inflorescência e (c) ramo florífero.....	5
Figura 3. <i>Cymbopogon citratus</i> (dc.) Stapf. (a) forma arbustiva, (b) detalhe das lâminas foliares e (c) detalhe da inflorescência.	7
Figura 4. <i>Mentha spicata</i> L. (a) forma do arbusto, (b) detalhe das folhas e (c) detalhe da inflorescência	8
Figura 5. <i>T. X citriodorus</i> (pers.) Schreb. (a) detalhe da folhas, (b) detalhe dos ramos e flores.....	10
Figura 6. Diferentes estruturas químicas de flavonoides.....	15
Figura 7. Estrutura genérica dos flavonoides.	15
Figura 8. Reação entre o radical DPPH (violeta) e um antioxidante, bloqueando o radical DPPH (amarelo). Os espectros uv/vis correspondentes são exibidos. Uma diminuição significativa da absorvância a 515 nm aparece durante a reação e pode ser utilizada para seguir a reação.....	18
Figura 9. Formação de complexo pela reação entre molécula de malondialdeído (produto de peroxidação lipídica) e duas moléculas de ácido tiobarbitúrcio.	20
Figura 10. Representação esquemática do ensaio DPPH.	28
Figura 11. Representação esquemática do ensaio do poder redutor..	29
Figura 12. Representação esquemática do ensaio de inibição de descoloração do β -caroteno.....	30
Figura 13. Representação esquemática do ensaio de inibição da peroxidação lipídica através de produtos reativos de ácido tiobarbitúrcio.....	31
Figura 14. Perfil fenólico do extrato aquoso do lote reserva de <i>M. spicata</i> , preparado por infusão, registado a 280 nm. Todos os números apresentados no cromatograma correspondem aos compostos identificados na tabela 1	36
Figura 15. Perfil fenólico do extrato aquoso do lote reserva de <i>C. citratus</i> , preparado por infusão, registado a 370 nm. Todos os números apresentados no cromatograma correspondem aos compostos identificados na tabela 2	39
Figura 16. Perfil fenólico do extrato aquoso do lote reserva de <i>A. citriodora</i> , preparado por infusão, registado a 280 nm. Todos os números apresentados no cromatograma correspondem aos compostos identificados na tabela 3	41
Figura 17. Perfil fenólico do extrato aquoso do lote normal de <i>T. citriodorus</i> , preparado por infusão, registado a 280 nm. Todos os números apresentados no cromatograma correspondem aos compostos identificados na tabela 4	43



ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Tempo de retenção (Tr), comprimento de onda de absorvância máxima na região do visível (λ_{\max}), informação dos espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos na infusão de <i>M. spicata</i> , lotes normal e reserva (média \pm SD).....	35
TABELA 2. Tempo de retenção (Tr), comprimento de onda de absorvância máxima na região do visível (λ_{\max}), informação dos espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos na infusão de <i>C. citratus</i> , lotes normal e reserva (média \pm SD).....	40
TABELA 3. Tempo de retenção (Tr), comprimento de onda de absorvância máxima na região do visível (λ_{\max}), informação dos espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos na infusão de <i>A. citriodora</i> , lotes normal e reserva(média \pm SD).....	42
TABELA 4. Tempo de retenção (Tr), comprimento de onda de absorvância máxima na região do visível (λ_{\max}), informação dos espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos na infusão de <i>Thymus</i> \times <i>citriodorus</i> , lotes normal e reserva(média \pm SD).	44
TABELA 5. Atividade antioxidante das infusões elaboradas a partir dos lotes normal e reserve das espécies <i>M. spicata</i> , <i>C. citratus</i> , <i>A. citriodora</i> e <i>T. citriodorus</i> , expressas em valores de EC ₅₀ (mg/mL).	46

ABREVIATURAS

2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo	DPPH
Absorvância	Abs
Ácido Desoxiribonucleico	ADN
Ácido Ribonucleico	RNA
Ácido tiobarbitúrico	TBA
<i>Aloysia citriodora</i>	Ac
Atividade Captadora de Radicais	ACR
Catalase	CAT
Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante	EC₅₀
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	HPLC
<i>Cymbopogon citratus</i>	Cc
Desvio Padrão	SD
Detetor de Díodos	DAD
Espécies Reativas de Azoto	RNS
Espécies Reativas de Enxofre	RSS
Espécies Reativas de Oxigênio	ROS
Espectrometria de Massa	MS
Estados Unidos da América	EUA
Administração de Alimentos e Medicamentos	FDA
Geralmente Reconhecido como Seguro	GRAS
Glutationa	GSH
Glutationa Peroxidase	GPx
Glutationa Redutase	Gred
Ionização por Electrospray	ESI
Malondialdeído	MDA
<i>Menta spicata</i>	Ms
Poder antioxidante por redução do ião ferro	FRAP
Radiação Ultravioleta	UV
Radiação Visível	VIS
Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico	TBARS
Superoxido Dismutase	SOD
<i>Thymus x citriodorus</i>	Tc
Vestígios	tr



RESUMO

Recentemente, com a evolução do mercado do chá e devido à crescente procura pela novidade por parte dos consumidores, as empresas de plantas têm vindo a desenvolver novos produtos de valor acrescentado, com características exclusivas. Entre estes produtos, os lotes de reserva de plantas aromáticas, surgem como uma seleção de partes específicas de plantas, preparadas através de técnicas de colheita distintas, que lhes confere características organoléticas singulares.

No presente estudo foram avaliados quatro espécies de plantas amplamente consumidas em Portugal, entre elas a *Mentha spicata* L., *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Aloysia citriodora* (L'Herit.) Britton, e *Thymus × citriodorus* L., de forma a explorar as diferenças entre infusões preparadas a partir dos lotes normais e reserva, no que respeita à sua composição fenólica e às suas propriedades antioxidantes. As infusões obtidas pelos lotes reserva de *M. spicata*, *C. citratus* e *A. citriodora* revelaram uma maior concentração em compostos fenólicos do que os preparados através dos lotes normais. Por outro lado, a infusão obtida através do lote normal de *T. citriodorus* apresentou maiores quantidades de ácidos fenólicos do que o lote reserva, no entanto, a quantidade de flavonoides totais e compostos fenólicos não foi significativamente diferente do lote reserva.

Ambos os lotes de *M. spicata* apresentam o ácido rosmarínico como sendo o composto fenólico maioritário, no entanto o lote reserva foi o que apresentou maior teor em compostos fenólicos totais. *C. citratus* revelou uma prevalência de flavonoides, com uma elevada contribuição de luteolina 2''-O-deoxi-hexosil-6-C-glucósido, mas o composto mais abundante foi o ácido 5-O-cafeoilquínico em ambos os lotes. Relativamente à *A. citriodora* a luteolina-7-O-diglucurónido e verbascósido foram os compostos maioritários identificados. Em *T. citriodorus*, em ambos os lotes registou-se uma prevalência de ácidos fenólicos, sendo o ácido rosmarínico o mais abundante, seguido do ácido litospérmico A e de um hexósido de ácido rosmarínico.

Em termos de atividade antioxidante, as diferenças entre lotes foram mais evidentes nas infusões de *C. citratus* e *M. spicata* do que nas restantes infusões, sendo o lote reserva, aquele que apresentou maior atividade antioxidante. Em geral, a atividade



antioxidante das infusões preparadas a partir de diferentes lotes de plantas está correlacionada positivamente com a sua composição fenólica.



ABSTRACT

Recently, with the evolution of the tea market, given the increasing consumers demand for novelty, tea companies have been presenting new added value products with alternative traits. Among these products, the reserve lots of aromatic plants arise as a selection of specific parts of the plants, prepared through distinct harvesting techniques that confer them singular organoleptic characteristics.

In the present study, four widely consumed specimens in Portugal, *Mentha spicata* L., *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Aloysia citriodora* (L'Herit.) Britton, and *Thymus* × *citriodorus* L. were assessed to explore the differences between infusions prepared from their standard and reserve lots, in what concerns the phenolic composition and related antioxidant properties. The infusions obtained from *M. spicata*, *C. citratus* and *A. citriodora* reserve lots revealed higher concentration in phenolic compounds than those prepared from the respective standard lots. Otherwise, the infusion of *T. citriodorus* standard lot presented higher amounts of phenolic acids than the reserve lot, nonetheless, total flavonoids and phenolic compounds were not significantly different between both lots.

The two types of *M. spicata* lots presented rosmarinic acid as the most abundant phenolic compound, but the reserve lot had the highest total phenolic compounds content. *C. citratus* revealed a prevalence of flavonoids, with the highest contribution of luteolin 2''-*O*-deoxyhexosyl-6-*C*-glucoside, but the most abundant compound was 5-*O*-caffeoylquinic acid in both lots. Regarding *A. citriodora*, luteolin-7-*O*-diglucuronide and verbascoside were the major compounds identified. In *T. citriodorus*, both lots revealed the prevalence of phenolic acids, with rosmarinic acid as the most abundant, followed by lithospermic acid A and rosmarinic acid hexoside.

In terms of antioxidant activity, the differences between both lots were more noticeable in *C. citratus* and *M. spicata* than in the other plants infusions, with the reserve lot presenting the highest activity. In general, the antioxidant activity of the infusions prepared from the different lots of the plants was positively correlated to their phenolic composition.

CAPÍTULO I





1. INTRODUÇÃO

1.1 Consumo

As plantas foram constituídas como base dos sistemas sofisticados da medicina tradicional, cuja existência remonta de há milhares de anos e tornaram-se alvo de estudo até aos dias de hoje, sendo utilizadas em preparações farmacêuticas, alimentares e nutracêuticas (Gurib-Fakim, 2006). As infusões e decocções são consideradas as formas bebíveis de “ervas” mais utilizadas (Fotakis *et al.*, 2016). O chá (a partir da infusão de *Camellia sinensis* L. Kuntze), por exemplo, é designado por diversos autores (Chan, Lim, Chong, Tan, & Wong, 2010; Diniz, Barbosa, Milanez, Pistonesi, & Araújo, 2016; Barroso, *et al.*, 2016; Schulzki, Nublein, & Sievers, 2017) como sendo a segunda bebida não alcoólica mais consumida no mundo (depois da água) e uma das mais antigas (descoberta em 2700 A.C.) (FAO, 2015).

No entanto, nos últimos anos, as infusões de ervas ou frutos (preparadas a partir de plantas ou partes de plantas secas, como por exemplo: frutos, flores, folhas, raízes, casca, não procedentes do arbusto de chá embebidas em água fervente) tornam-se cada vez mais populares na Europa, como parte de uma dieta bem equilibrada, pois não contêm açúcar, quase sem calorias e oferecem uma vasta gama de sabores (Chan, Lim, Chong, Tan, & Wong, 2010; Schulzki, Nublein, & Sievers, 2017).

O aumento do consumo de infusões a partir de plantas medicinais e aromáticas em todo o mundo tem-se tornado evidente, de modo que a sua popularidade mundial progrediu de forma drástica, com um volume de vendas que aumentou em cerca de 500% em apenas dez anos, em alguns países (Godoy *et al.*, 2013).

Por conseguinte, a indústria do chá, acompanhando as tendências de mercado, evoluiu para um setor altamente sofisticado e competitivo. Assim sendo, hoje em dia, é possível observar o surgimento de diversos produtos de valor acrescentado, nos quais os consumidores têm à sua disposição uma ampla gama de lotes diferentes com composições distintas da mesma planta para a preparação de infusões. A título de exemplo, são os lotes de reserva (que evoluíram a partir de lotes *standard*) constituídos a partir das partes mais jovens (folhas apicais) da planta e coletadas nos meses mais quentes de verão, estes requisitos especiais de colheita, permitem desta forma obter lotes com composições



diferentes que lhes conferem características organolépticas e sensoriais notáveis (Rita, Pereira, Barros, Santos-Buelga, & Ferreira, 2016). Além de fornecerem aromas e sabores agradáveis, estas bebidas funcionais têm sido amplamente estudadas/procuradas pelos benefícios fisiológicos que aportam para o nosso organismo, prevenindo ou retardando o aparecimento de diversas doenças crónicas. (Pereira, Barros, & Ferreira, 2015).

1.2 Caracterização das matrizes abordadas neste estudo

Tendo em vista as inúmeras potencialidades destas bebidas e o aumento da procura destes produtos por parte dos consumidores (principalmente daqueles, cujas funções específicas, estão relacionadas com a saúde) (Godoy *et al.*, 2013), selecionaram-se quatro espécies, reconhecidas internacionalmente, consumíveis sob a forma de infusão e com certa relevância económica, cujos produtos são passíveis de ser encontrados no mercado em diversas conformações, como por exemplo, a comercialização de lotes *premium* ou reserva (**Figura 1**), que variam dos lotes comuns pelas suas características singulares de colheita, como referidos anteriormente.



Figura 1. Lotes Reserva comercializados pela Empresa “Cantinho das Aromáticas”.

1.2.1 *Aloysia citrodora* Gómez Ortega & Palau

Aloysia citrodora Gómez Ortega & Palau (**Figura 2**) apresenta uma sinonímia científica bastante vasta, podendo ser conhecida botanicamente por *Verbena citrodora* Cav., *Lippia citrodora* Kunth, *Zappania citrodora* Lam., *Aloysia triphylla* (L’Hérit.) Britton, *Lippia triphylla* (L’Hér.) Kuntze e *Verbena triphylla* L’Hér. Em relação aos nomes vernáculos portugueses apresentados para esta espécie podem-se encontrar



designações, tais como: bela-alóisia, bela-luísa, cidrila, doce-lima, limonete, lúcia-lima, pessegueiro-inglês e verbena-cidrada (Castroviejo, 1986-2012).

Esta espécie é espontânea na América do sul e é cultivada no norte de África (Marrocos) e sul da Europa (Carnat, Carnat, Fraisse, & Lamaison, 1999) , no qual foi introduzida no final do século XVII (Quirantes-Piné, Herranz-López, Funes, & Borrás-Linares, 2013). O nome científico *Aloysia* foi atribuído em honra a María Luisa de Borbón-Parma, rainha de Espanha por casamento com Carlos IV, e *triphylla* pelo número de folhas em cada verticilo (Gomes, 2012). *A. citrodora* é uma angiospérmica dicotiledónea, integra-se na ordem Lamiales, família das Verbenaceae e género *Aloysia*. É uma espécie arbustiva (2 a 6 m), caducifólia, escábrida (áspera ao tato), com aroma agradável a limão. Apresenta caules eretos, quando adultos são mais ou menos cilíndricos e glabrescentes, e os jovens exibem secção quadrangular, estriada, escábrida, com pêlos antrosos até 0,2 mm. Com 3 lâminas foliares em cada verticilo, raramente 4, limbo da folha lanceolada a estreitamente lanceolada, com ápice agudo e base atenuada, de margem inteira ou ligeiramente ondulada. A inflorescência pode atingir os 25 cm, é terminal em forma de panícula, laxa e apresenta frequentemente espigas ou racimos de espigas solitários na axila de cada folha superior. As suas flores são sésseis ou subsésseis (com corola de cor branca ou lilacénea) agrupadas em verticilos trímeros, e às vezes solitárias. Apresenta um fruto ovoide ou oblongo de cor castanha, com mericarpos plano-convexos, pilosos no ápice (Castroviejo, 1986-2012).

As folhas de limonete são amplamente usadas tanto em culinária, devido às suas propriedades aromáticas, em diversos pratos de peixe, aves, marinadas vegetais, em saladas, geleias, pudins e bebidas, como infusão de ervas e sorvetes refrescantes (Funes *et al.*, 2009), são também usadas pelas suas propriedades digestivas, antiespasmódicas, antipiréticas, antioxidantes e sedativas (Infante, Rubio, Contador, & Moreno, 2010; El-Hawary, Yousif, Abdel Motaal, & Abd-Hameed, 2012; Quirantes-Piné, Herranz-López, Funes, & Borrás-Linares, 2013).



Figura 2. *Aloysia citrodora* Gómez Ortega & Palau. (A) forma arbustiva, (B) detalhe da inflorescência e (C) ramo florífero (Crespí & UTAD, s.d.)

O limonete tem sido tradicionalmente empregue no tratamento de asma, constipações, febre, espasmos, flatulência, cólicas, diarreia, indigestão, insónia e ansiedade (Bensabah, Lamiri, & Naja, 2015). A bioatividade desta espécie está associada à presença de óleo essencial e de diversos compostos polares como fenilpropanóides, flavonoides, ácidos fenólicos e iridoides glicosídicos (Carnat, Carnat, Fraisse, & Lamaison, 1999; Quirantes-Piné, Herranz-López, Funes, & Borrás-Linares, 2013). O verbascósido (acteósido), um fenilpropanóide glicosídico, compreende 0,5 a 3,5% do peso seco de folhas de *A. citrodora*. Foram descritas diversas propriedades relacionadas a este composto, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, anti-bacterianos, anti-tumorais, anti-fúngicos, fotoprotectores e quelantes (Funes *et al.*, 2009; Etemad *et al.*, 2016).

1.2.2 *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf, comumente conhecida como erva-príncipe (**Figura 3**) e anteriormente descrita como *Andropogon citratus* por De Candolle e reclassificado por Otto Stapf (Negrelle & Gomes, 2007), é um arbusto perene e cresce em



regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (Naik, Fomda, Jaykumar, & Bhat, 2010). Pensa-se que a sua origem advém da Malásia, Indochina e Sri-Lanka (Adeneye & Agbaje, 2007). No entanto, o principal exportador desta planta é a Guatemala, que comercializa cerca de 250.000 kg por ano, enquanto que os EUA importam cerca de 70.000 kg por ano (Costa, Grangeia, Figueirinha, Figueiredo, & Batista, 2016).

O termo *Cymbopogon* deriva da palavra grega *kymbe* (barco) e *pogon* (barba), referindo-se à sua inflorescência, e *Citratus* deriva do latim arcaico, que significa folhas com aroma a limão. É uma angiospérmica, monocotiledónea, pertencente à ordem das Cyperales, família das Poaceae (Gramineae) e género *Cymbopogon*. É uma espécie perene, formando touceiras de até 2 metros de altura, com rizomas curtos. Lâminas foliares eretas, glaucas que vão-se afiliando em direção à bainha, com lígulas arredondadas ou truncadas. Possui inflorescência paniculada, composta por pares de ráculos espiciformes (espiguetas), uma séssil e outra pedunculada. As espiguetas são canaliculadas no lado ventral, margens crescentes, ciliadas. Glumas, a inferior lanceolada, bilobulada no ápice e a superior lanceolada, normalmente nervada. Lemna lanceolada bífida. O fruto é uma cariopse oblonga e indeiscente (Negrelle & Gomes, 2007; Royal Botanic Gardens).

Devido às suas propriedades aromáticas a limão é muito utilizado na gastronomia asiática (Ajayi, Sadimenko, & Afolayan, 2016). *C. citratus* é igualmente considerada uma espécie de elevado valor económico devido às suas aplicações nas diversas áreas da indústria da perfumaria, cosmética, farmacêutica e alimentar, como também pela sua elevada capacidade de adaptação a climas moderados e condições climáticas extremamente críticas (Costa, Grangeia, Figueirinha, Figueiredo, & Batista, 2016). A infusão de erva-príncipe tem suscitado um enorme interesse por parte dos consumidores, devido às suas características físico-químicas, incluindo sabor, aroma (distintivo a limão), cor e intensidade.

No entanto, muitos outros consumidores utilizam a infusão ou decocção desta planta por razões fisiológicas (Ekpenyong, Akpan, & Nyoh, 2015). Vários estudos apontam para o seu uso tradicional como agente anti-inflamatório, antipirético, antiprotozoário, antifúngico, anti-malárico, antiespasmódico, anticancerígeno, antioxidante, cardioprotetor, antitússico, antirreumático, analgésico, diurético, sedativo e



no tratamento de distúrbios gastrointestinais e nervosos (Ekpenyong, Akpan, & Nyoh, 2015; Chukwuocha, Fernández-Rivera, & Legorreta-Herrera, 2016; Costa *et al.*, 2016), no entanto na Tailândia esta planta é usada como repelente de insetos (Soonwera & Phasomkusolsil, 2015).



Figura 3. *Cymbopogon citratos* (DC.) Stapf. (A) forma arbustiva, (B) detalhe das lâminas foliares e (C) detalhe da inflorescência (Soul, 2011; McDonald, 2013; Herbals, 2016).

1.2.3 *Mentha spicata* L.

Mentha spicata L., (**Figura 4**) designada vernaculamente como hortelã, hortelã-comum, hortelã-das-cozinhas, hortelã-verde, hortelã-vulgar, mantrage, mentastro, mentastro-das-boticas, mentrasto e montraste. Esta planta é nativa da África, Ásia temperada e Europa e encontra-se amplamente distribuída pela Europa, África, Ásia e América do Norte juntamente com outras espécies do mesmo género (19 espécies e 13 híbridos naturais) (Kedia, Prakash, Mishra, Chanotiya, & Dubey, 2014).

M. spicata é uma angiospérmica, dicotiledónea, pertencente à ordem das Lamiales, da família das Lamiaceae e género *Mentha* L. Erva rizomatosa, com caules glabros ou glabrescentes, folhas de ovadas a lanceoladas, levemente dentadas, arqueadas para baixo, rugosas na epiderme superior, com nervuras bem marcadas na epiderme inferior, glabras ou pilosas somente nas nervuras e com glândulas esferoidais na epiderme



inferior, quanto à cor das folhas, a epiderme superior apresenta um tom verde mais escuro e a epiderme inferior um tom mais claro.



Figura 4. *Mentha spicata* L. (A) forma do arbusto, (B) detalhe das folhas e (C) detalhe da inflorescência. (Oakeley; Plants; UTAD)

A inflorescência é uma espiga laxa formada por 6-23 verticilastros, mais ou menos separados, com 28 flores ou mais em cada um, por vezes ramificada ou composta, com brácteas aciculares ou lanceoladas e bractéolas lineares mais pequenas. Quanto às flores, estas apresentam cálice de cor creme ou púrpura e anteras de cor roxa. Núculas (ou clusas) elipsoides com superfície de inserção grande e branca de cor pardo (Castroviejo, 1986-2012).

A hortelã é uma espécie com relevância económica e é extensivamente usada na indústria alimentar e farmacêutica, perfumaria e confeitaria, como também aplicada a pastilhas elásticas e a pasta de dentes. Esta também é muito utilizada para a produção de óleos essenciais e foi reconhecida como segura (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA) numa dieta regular, podendo ser consumida com segurança (Crysargyris, Nikolaidou, Stamatakis, & Tzortzakis, 2017). É conhecida pela sua capacidade de favorecer as funções da memória, por exemplo o extrato de folhas cozidas é usado para aliviar soluços (contração espasmódica e involuntária do diafragma),



flatulência, vertigens, bronquite, é também usado como anti-inflamatório e para controlar os vômitos durante a gravidez. Também atua como agente inseticida, antimicrobiano, antiespasmódico, antiagregante plaquetário e antioxidante (Arumugam, Priya, Subathra, & Ramesh, 2008; Rita, Pereira, Barros, Santos-Buelga, & Ferreira, 2016).

1.2.4 *Thymus x citriodorus* (Pers.) Schreb.

Thymus x citriodorus (Pers.) Schreb. tradicionalmente conhecido como tomilho limão, nome atribuído devido ao seu agradável aroma a limão (**Figura 5**), é um híbrido de *Thymus vulgaris* L. *Thymus pulegioides* L. (Schmidt, Bischof-Deichnik, & Stahl-Biskup, 2004). É uma angiospérmica, dicotiledónea, pertencente à ordem das Lamiales, família das Lamiaceae e género *Thymus*. Este género contém cerca de 220 espécies, estas hibridam facilmente, principalmente aquelas que partilham do mesmo número cromossomático. O tomilho limão é uma planta sufruticosa, perene e ereta, com caules de seção quadrangular ou arredondada. Os rebentos e folhas são geralmente pilosos. As folhas são, opostas, glaucas com bordas brancas. A inflorescência é formada por verticilastros mais ou menos densos, com flores de cor rosa (Castroviejo, 1986-2012; Omidbaigi, Sefidkon, & Hejazi, 2005).

O tomilho limão é uma espécie nativa do sul da Europa, sendo cultivada na região mediterrânea para fins culinários e fins medicinais em forma de infusão (Pereira, Peres, Silva, Domingues, & Cardoso, 2013). Tem sido usada como diaforético e no tratamento de bronquite e verificou-se que possui propriedades desodorizantes, antissépticas, antimicrobianas, antifúngicas, hepatoprotetoras e antioxidantes (Omidbaigi, Sefidkon, & Hejazi, 2005; Pereira, Macias, Perez, Marin, & Cardoso, 2013).

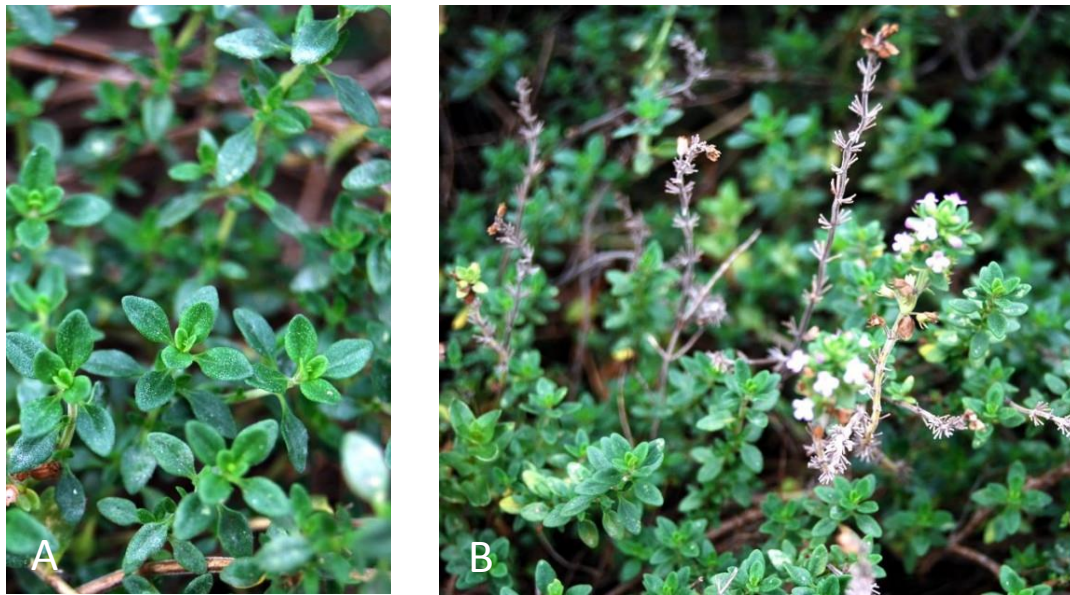


Figura 5. *T. x citriodorus* (Pers.) Schreb. (A) detalhe da folhas, (B) detalhe dos ramos e flores. (García-Cabral & UTAD)

1.3 Antioxidantes

No contexto anterior é possível verificar que todas as espécies referidas apresentam potencial bioativo, que depende diretamente das características do conjunto de fitoquímicos presentes, alguns deles são biologicamente ativos, enquanto outros necessitam de ser metabolizados, extraídos ou ambos para exercer efeitos benéficos (Pires M.S., Martins, Carvalho, Barros, & Ferreira, 2016).

Grande parte destas propriedades bioativas estão relacionadas com a presença de compostos fenólicos, especialmente flavonoides. Este grupo de biomoléculas tem sido alvo de diversos estudos e associado a propriedades antioxidantes e à consecutiva redução de doenças crónicas induzidas pelo *stress* oxidativo (Barroso *et al.*, 2014). O *stress* oxidativo foi definido por Sies (1985) como “uma perturbação no equilíbrio prooxidante-antioxidante em favor do primeiro” (Niki, 2016), ou seja, o *stress* oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas em detrimento das defesas antioxidantes. As espécies reativas, coloquialmente denominadas por radicais livres, são átomos, moléculas ou iões com um ou mais eletrões desemparelhados, e por isso são altamente instáveis e ativas em relação a reações químicas com outras moléculas. Podem derivar de três elementos: oxigénio (ROS, espécies reativas de oxigénio), azoto (RNS,



espécies reativas de azoto) e enxofre (RSS, espécies reativas de enxofre), sendo que as de azoto e enxofre derivam das de oxigénio.

As ROS incluem espécies reativas radicalares como o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroperóxilo (HO_2^{\cdot}), radical hidroxilo ($\cdot OH$), óxido nítrico (NO) e outras espécies como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), oxigénio singleto (1O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito ($ONOO^-$). As RNS derivam da reação de NO com $O_2^{\cdot-}$, formando $ONOO^-$. As RSS são facilmente formadas a partir da reação de ROS com tióis, formando dissulfuretos, estes podem ser oxidados pelo peróxido de hidrogénio a pH fisiológico, dando lugar a monóxido e dióxido de dissulfuretos. Os efeitos da formação de RSS podem ser comparáveis aos efeitos do peroxinitrito, apesar de interagirem especificamente com tióis e, por isso, possuem alvos celulares específicos. No entanto existem outros compostos de enxofre em estados de oxidação elevados, que incluem radicais de tiolo, trissulfuretos e ácidos sulfénicos. (Giles, Tasker, & Jacob, 2002; Carochó & Ferreira, 2013). Os principais alvos de ROS, RNS e RSS são proteínas, moléculas de ADN (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico), açúcares e lipídios. As proteínas são consideradas os alvos celulares iniciais mais prováveis, em relação ao $\cdot OH$ e outros radicais fortemente oxidantes, pois constituem cerca de 70% da massa das células. Existem três maneiras distintas das proteínas serem modificadas oxidativamente: i) modificação oxidativa de um aminoácido específico, ii) clivagem de péptidos mediada por radicais livres e iii) formação de reticulação proteica devido à reação com produtos da peroxidação lipídica (Carochó & Ferreira, 2013; Gebicki, 2016).

No ADN os danos produzidos podem ser de natureza química ou estrutural, seguindo um padrão específico de modificações, como a produção de zonas com bases livres, deleções, ruturas nas cadeias, modificação de todas as bases, alterações estruturais, ligações cruzadas ADN-proteína e arranjos cromossómicos (Cadet *et al.*, 1999; Chatgililoglu & O'Neill, 2001; (Dizdaroglu, Jaruga, Birincioglu, & Rodriguez, 2002; Carochó & Ferreira, 2013).

Em relação aos açúcares, os radicais livres formados durante a glicação precoce podem contribuir para o dano glicoxidativo. Durante os estágios iniciais de glicosilação não enzimática, a fragmentação do açúcar produz espécies de cadeia curta como o glicaldeído, cuja cadeia é demasiado curta para ciclizar e, por conseguinte, propensa a



auto-oxidação, formando o radical superóxido. A reação em cadeia resultante do radical pode formar α e β -dicarbonilos, que são mutagénicos (Sarma & Medhi, 2006; Carochó & Ferreira, 2013).

Já a peroxidação lipídica é iniciada por um ataque mediado por um radical, no qual a cadeia lateral de um ácido gordo é atacada a fim de abstrair um átomo de hidrogénio de um carbono metileno. Quanto mais ligações duplas se apresentem nos ácidos gordos, mais fácil se torna a remoção de hidrogénios e consequentemente a formação de um radical. Após essa remoção, o radical lipídico do carbono central pode sofrer rearranjo molecular, reagindo com oxigénio formando um radical peróxido. Estas moléculas altamente reativas podem interagir com o hidrogénio de moléculas circundantes e propagar uma reação em cadeia de peroxidação lipídica (Carochó & Ferreira, 2013). Estes acontecimentos podem desencadear uma série de processos patológicos graves como cancro, doenças cardiovasculares (aterosclerose e AVC), distúrbios neurológicos, renais, hepáticos, hipertensão, artrite reumatoide, inflamação, doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, diabetes mellitus, complicações diabéticas, cataratas, obesidade, autismo, Alzheimer, Parkinson e Huntington, vasculite, glomerulonefrite, lúpus eritematoso, úlceras gástricas, hemocromatose e pré-eclampsia, entre outras (Carochó & Ferreira, 2013; Lespade, 2013; Pisoschi & Pop, 2015).

Contudo, estas espécies reativas são importantes do ponto de vista fisiológico, pois atuam em diversos processos, como neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa e regulação da resposta imunitária (Ferreira, Barros, & Abreu, 2009), no entanto, deve-se preservar o equilíbrio (de produção de radicais e defesas antioxidantes), para o qual é necessário que haja uma manutenção de bons níveis de antioxidantes e eliminadores de radicais livres, conseguida através da dieta alimentar e evitando comportamentos que conduzam a uma maior produção de espécies reativas de oxigénio, como tabaco, exposição a ambientes poluentes e xenobióticos (Barros, Dueñas, Carvalho, Ferreira, & Santos-Buelga, 2012). As fontes endógenas mais significativas de espécies oxidantes responsáveis pelo envelhecimento foram identificadas nas mitocôndrias, principalmente na cadeia transportadora de eletrões e nas reações de síntese-catálise de óxido nítrico. As fontes de radicais livres não mitocondriais são as que resultam da reação de Fenton, complexo enzimático do citocromo P450 microsomal, a beta-oxidação peroxissomal e as células fagocíticas ativadas (Pisoschi & Pop, 2015).



Os antioxidantes interagem com os radicais livres concluindo a reação em cadeia antes das moléculas vitais serem danificadas. Estes atuam por diversos mecanismos: espécies captadoras que iniciam a peroxidação lipídica; iões que quelatam metais, de modo que sejam incapazes de gerar espécies reativas ou decompõem peróxidos; extinção de $O_2^{\cdot-}$ para impedir formação de peróxidos; quebra das reações auto-oxidativas em cadeia e a redução de concentrações localizadas de O_2 (Oroian & Escriche, 2015). Existem diferentes defesas antioxidantes endógenas enzimáticas, estas são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (Gred), já as defesas endógenas não enzimáticas incluem a glutathione (GSH), ácido lipoico, ácido úrico entre outros. Apesar do nosso organismo produzir estas defesas, é necessário incorporar através da dieta alimentar novas fontes de moléculas bioativas, com potencial antioxidante de modo a combater a produção excessiva de espécies reativas.

Uma infinidade de antioxidantes naturais já foram isolados de diferentes matrizes vegetais, como oleaginosas, cereais, vegetais, frutas, folhas, raízes, especiarias e ervas, o consumo das mesmas está fortemente associado à redução de risco de desenvolver doenças crónicas, como cancro e doenças cardiovasculares (Ferreira, Barros, & Abreu, 2009). Consideram-se defesas antioxidantes exógenas a vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) e K, compostos fenólicos, como flavonoides e ácidos fenólicos, carotenoides e alguns minerais (Carocho & Ferreira, 2013). As infusões preparadas com diferentes espécies de plantas são uma excelente alternativa para a obtenção destes princípios ativos, podendo contribuir consideravelmente para o aumento de ingestão de compostos biologicamente ativos, como o caso dos compostos fenólicos, este é considerado um dos grupos de compostos bioativos com efeitos benéficos para a saúde (Port's, Chisté, Godoy, & Prado, 2013).

1.3.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são ubíquos em todos os órgãos das plantas e portanto integram-se na dieta humana. Já foram relatadas mais de 8000 estruturas de fenólicos, estando dispersos extensamente por todo o reino Plantae (Oroian & Escriche, 2015). Na última metade do século XX, o interesse nestes compostos obtidos através dos alimentos aumentou devido às suas capacidades antioxidantes e de eliminação de radicais livres,



anti-inflamatória, modulação da transdução de sinal, atividades anti-microbianas e anti-proliferativas (Oroian & Escriche, 2015).

Os mecanismos de ação antioxidante mais citados para os compostos fenólicos são a sua capacidade de eliminar espécies reativas de oxigénio e a capacidade como agentes quelantes de iões metálicos. A biodisponibilidade e a atividade biológica destes compostos estão relacionadas com a sua estrutura química e bio-distribuição no organismo (Port's, Chisté, Godoy, & Prado, 2013).

Estas moléculas aromáticas hidroxiladas possuem um ou mais anéis aromáticos contidos na sua estrutura com um ou mais grupos hidroxilo, estes encontram-se vulgarmente, como já citado anteriormente, em diversos vegetais, frutas e outras classes de alimentos que fazem parte de uma porção significativa da nossa dieta. Os compostos fenólicos acumulam-se como produtos finais da via do shikimato e acetato, podendo variar desde moléculas relativamente simples (ácidos fenólicos, fenilpropanoides e flavonoides) até compostos imensamente polimerizados (lenhinas, melaninas e taninos), sendo que os flavonoides são considerados o subgrupo mais comum e com ampla distribuição nas plantas (Ferreira, Barros, & Abreu, 2009).

Os ácidos fenólicos são constituídos por derivados de ácido benzóico (ácidos hidroxibenzóicos) e do ácido cinâmico (ácidos hidroxicinâmicos), consistem num anel benzénico acoplado a um grupo carboxílico (ácidos benzóicos) ou a um ácido propanoico (ácidos cinâmicos) (Oroian & Escriche, 2015). Estes compostos exercem bioatividade agindo como quelantes e captadores de radicais livres, com especial impacto sobre os radicais hidroxilo e peróxido, e aniões superóxido e peroxinitritos. Um dos compostos mais estudados, dentro dos ácidos hidroxibenzóicos, é o ácido gálico, também precursor de muitos taninos e no caso dos ácidos hidroxicinâmicos, o ácido cafeico, pois este está presente em muitas matrizes e apresenta um elevado potencial antioxidante.

Os flavonoides são uma classe de compostos que inclui flavonóis, flavanóis, antocianinas, isoflavonoides, flavanonas e flavonas (**Figura 6**).

Todos estes subgrupos de compostos partilham o mesmo esqueleto de difenilpropano (C6-C3-C6) (**Figura 7**). A estrutura básica destes compostos consiste em



dois anéis aromáticos (anéis A e B) ligados por uma cadeia de três carbonos que é usualmente num anel heterocíclico oxigenado, ou anel C.

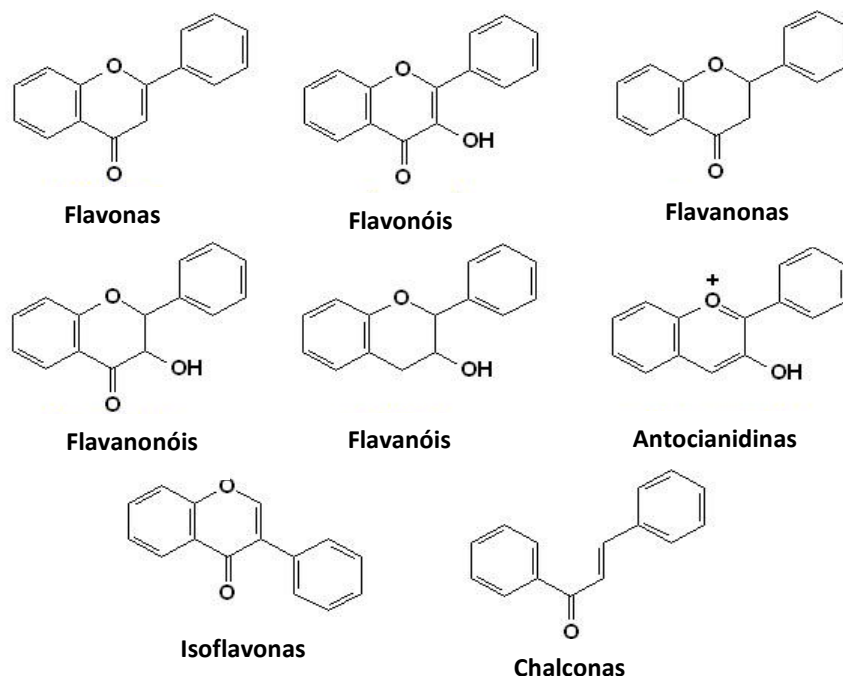


Figura 6. Diferentes estruturas químicas de flavonoides.

As flavanonas e flavonas normalmente são encontradas em conjunto (nas mesmas frutas) e estão unidas por enzimas específicas, enquanto que as flavonas e flavonóis não partilham deste fenómeno, pois existe uma exclusão mútua., no caso das antocianinas, estas também estão ausentes em espécies ricas em flavanonas (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1995).

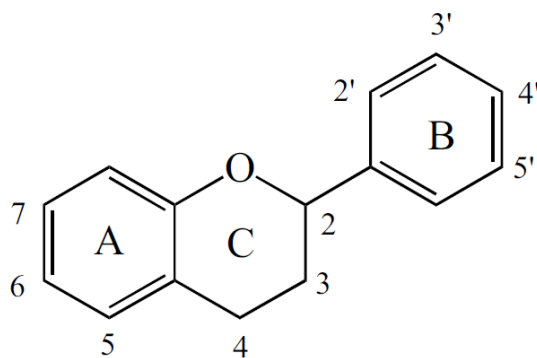


Figura 7. Estrutura genérica dos flavonoides.



As propriedades antioxidantes dos flavonoides resultam dos grupos hidroxilo presentes nos anéis da estrutura, podendo atuar como agentes redutores, doadores de hidrogénio, inibidores de oxigénio singlete e de radicais superóxido e agindo como quelantes metálicos. Também funcionam como ativadores de antioxidantes enzimáticos, reduzem os radicais α -tocoferol (tocoferoxilos), inibem oxidases, diminuem o *stress* nitrosativo e intensificam os níveis de ácido úrico e moléculas de baixo peso molecular (Carocho & Ferreira, 2013). Tendo em vista todos os benefícios concedidos através do consumo destas moléculas, existe uma necessidade de entender como tirar maior partido destas moléculas.

O teor de compostos bioativos presentes numa matriz vegetal é influenciado por diversos fatores, tanto físicos, como biológicos, incluindo também tempos de colheita, génotipos, técnicas de cultivo, condições climáticas durante o período de crescimento, entre outras. Portanto é necessário conhecer as acumulações sazonais dos princípios bioativos, de forma a desenvolver critérios bem definidos acerca do melhor período de coleta das plantas ou partes destas usadas para a formulação de infusões ou outros fins (Jiao *et al.*, 2013; Inui, Okumura, Matsui, Hosoya, & Kumazawa, 2017).

Diversos estudos têm sido realizados de modo a avaliar a composição de infusões de diversas matrizes e os seus potenciais efeitos para a saúde humana, ganhando desta forma uma grande relevância, atraindo consumidores para um maior consumo deste tipo de formulações (Jiao *et al.*, 2013). Devido a este fenómeno o estudo de comparação de diferentes lotes (normal e reserva) de infusões das espécies: *A. triphylla*, *C. citratus*, *M. spicata* e *T. citriodorus* pode ser uma mais-valia, a fim de fornecer informações científicas sobre as potenciais diferenças entre os dois diferentes tipos de lotes, de modo a auxiliar o consumidor numa escolha mais consciente (Rita, Pereira, Barros, Santos-Buelga, & Ferreira, 2016).

1.4 Avaliação da atividade antioxidante

Os métodos *in vitro* têm sido amplamente usados para a avaliação da atividade antioxidante de diversas matrizes (Oroian & Escriche, 2015). Existem inúmeros ensaios com esse objetivo, cada um com um alvo específico na matriz, no entanto todos apresentam vantagens e desvantagens. Não existem métodos que possam fornecer resultados inequívocos, por isso deve-se sempre optar por realizar diversos ensaios em



vez de se optar por uma abordagem unidimensional. Alguns destes procedimentos utilizam antioxidantes sintéticos ou radicais livres, outros são específicos para a peroxidação lipídica e tendem a necessitar de células animais ou vegetais e outros atuam num âmbito mais amplo (Carocho & Ferreira, 2013).

O ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) é um método espectrofotométrico amplamente utilizado por ser um método rápido e fácil para estudar a capacidade captadora de radicais livres dos antioxidantes. Foi inicialmente desenvolvido por Blois (1958), sendo a molécula do DPPH um radical livre estável, de coloração escura (violeta escuro) e solúvel numa solução alcoólica, como o metanol ou etanol. A sua absorção máxima é aproximadamente aos 515 nm, devido à existência de um eletrão não emparelhado. À medida que este eletrão se emparelha, devido à presença de um antioxidante (doador de H), a resistência à absorção diminui. Portanto pode-se observar uma mudança de cor violeta para amarelo (**Figura 8**). Esta alteração de cor é devido à alteração na absorvância, sendo utilizada para determinar a atividade antioxidante de uma molécula ou matriz (Wollinger *et al.*, 2016).

A partir deste ensaio é então possível determinar a concentração efetiva (EC_{50}) para os antioxidantes. Este parâmetro é definido como a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a absorvância de DPPH em 50% da absorvância inicial (Mishra, Ojha, & Chaudhury, 2012). Existem, no entanto, diversos fatores que podem influenciar os resultados obtidos, como o tempo de incubação ao qual é submetida a amostra e o tipo de solvente utilizado. A presença de oxigénio, luz e o pH da mistura reacional também podem afetar a absorvância de DPPH (Sharma & Bhat, 2009).

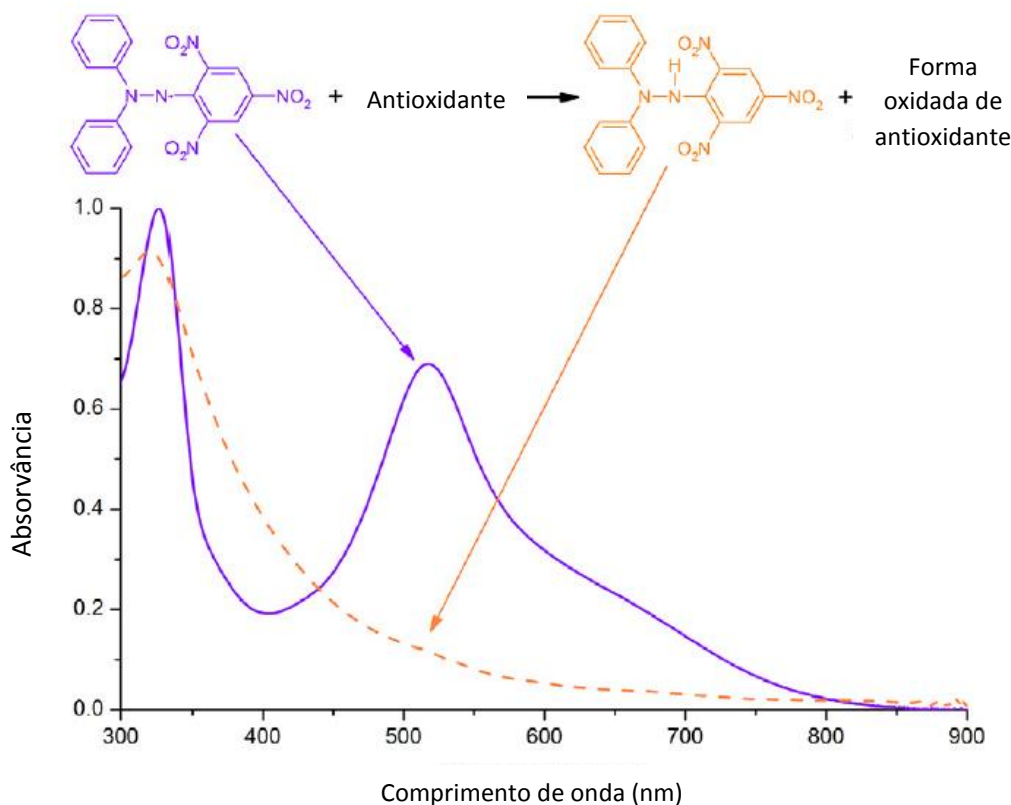
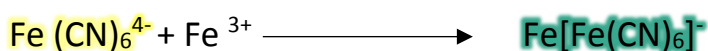
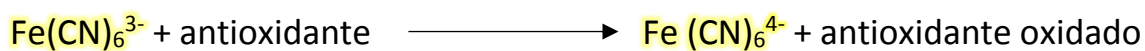


Figura 8. Reação entre o radical DPPH (violeta) e um antioxidante, bloqueando o radical DPPH (amarelo). Os espectros UV/VIS correspondentes são exibidos. Uma diminuição significativa da absorvância a 515 nm aparece durante a reação e pode ser utilizada para seguir a reação (Wollinger et al., 2016).

O ensaio FRAP (poder antioxidante por redução do ião férrico), baseia-se na capacidade de um composto reduzir o complexo tripiridiltriazina férrico amarelo (Fe (III) – TPTZ) ao complexo ferroso azul (Fe (II) – TPTZ) pela ação antioxidante doadora de elétrons, representado no esquema a seguir.



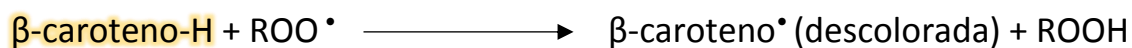
A resultante cor azul é posteriormente medida espectrofotometricamente a 690 nm. É uma técnica simples, rápida, barata e robusta e não requer equipamento especializado, pode ser realizado utilizando métodos automatizados, semiautomáticos ou manuais. No entanto esta técnica oferece algumas desvantagens, como por exemplo: o Fe



(II) é um “prooxidante” e pode reagir com H_2O_2 para produzir o radical hidroxilo (OH^\bullet) (considerado o radical mais nocivo). A capacidade de um composto produzir Fe (II) a partir de Fe (III) designado "poder antioxidante" no ensaio FRAP pode refletir na capacidade que alguns antioxidantes têm de reduzir espécies reativas, no entanto nem todos os redutores capazes de reduzir Fe (III) são antioxidantes, pois qualquer substância doadora de elétrons, mesmo sem propriedades antioxidantes com potencial redox inferior ao do par Fe (III)/ Fe (II), pode contribuir para o valor de FRAP e indicar valores falsamente positivos (Karadag, Ozcelik, & Saner, 2009).

Os carotenoides descoloram através de autooxidação induzida pela luz, calor ou radicais peróxido (Karadag, Ozcelik, & Saner, 2009). O ensaio de inibição de descoloração do β -caroteno é amplamente utilizado para medir a atividade antioxidante de extratos de plantas.

Os radicais lipídicos, produtos de auto-oxidação do ácido linoleico atacam as ligações duplas do β -caroteno provocando assim a sua descoloração que posteriormente é medida espectrofotometricamente a 470 nm (Kato, Aoshima, Saitoh, & Miwa, 2009). Esta descoloração pode ser prevenida pela ação dos compostos antioxidantes como se verifica no esquema seguinte:



Muitas vezes a descoloração de β -caroteno pode derivar de outros fatores e consequentemente dificultar a interpretação de resultados.

O ensaio de inibição de peroxidação lipídica através do método TBARS (ácido tiobarbitúrico) é muito utilizado, embora requerendo controlos rigorosos (Carocho & Ferreira, 2013). Este baseia-se na determinação espectrofotométrica do complexo rosa formado após a reação de uma molécula de malondialdeído (MDA) com duas moléculas de ácido tiobarbiturico (TBA), sendo medido a absorvância de 532 nm (**Figura 9**) ou por fluorescência a 553 nm (Carocho & Ferreira, 2013; Wenjiao, Yongkui, Yunchuan, Junxiu, & Yuwen, 2014).

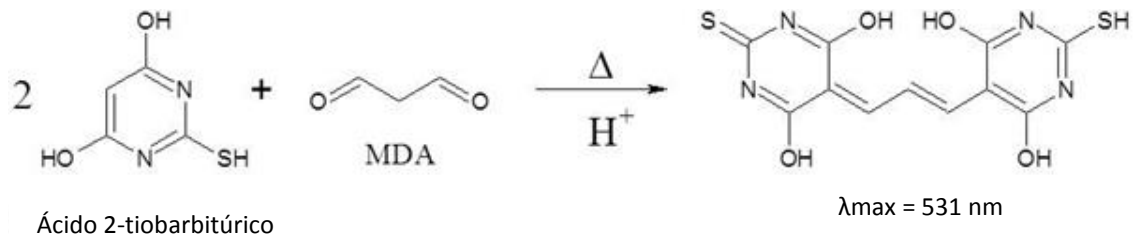


Figura 9. Formação de complexo pela reação entre molécula de malondialdeído (produto de peroxidação lipídica) e duas moléculas de ácido tiobarbitúrico.



2. OBJETIVOS

Tendo em vista o aumento do consumo de chá e as novas exigências do mercado, diversas empresas têm desenvolvido produtos com características diferenciadas de forma a satisfazer as necessidades do consumidor (Gramza-Michałowska, Kulczyński, Xindi, & Gumienna, 2016). Desta forma, surgem os lotes de reserva, caracterizados por conter partes de plantas específicas, coletadas através de técnicas otimizadas, que lhes fornecem uma notabilidade organolética distinta (Rita, Pereira, Barros, Santos-Buelga, & Ferreira, 2016). Entre estes, encontram-se quatro espécies economicamente importantes: *Aloysia tryphilla* (L'Herit.) Britton, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Mentha spicata* L. e *Thymus x citriodorus* (Pers.) Scherb., no qual se baseou este estudo.

Foi então realizada a avaliação da bioatividade dos lotes normais e reserva destas espécies, através da avaliação do potencial antioxidante em diferentes ensaios *in vitro*: atividade captadora de radicas DPPH, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica (ensaio β -caroteno e radical linoleato) e TBARS (inibição de produtos formados pela peroxidação lipídica que reagem com o ácido tiobarbitúrico).

Posteriormente procedeu-se à determinação do perfil de compostos bioativos, nomeadamente compostos fenólicos, através de análise de cromatografia de alta eficiência acoplada a detetores de díodos e de espectrometria de massa dos lotes normais e reserva das quatro espécies em estudo.

No final foi realizada a comparação dos resultados obtidos entre os dois lotes e os compostos detetados foram correlacionados com as bioatividades.

Através dos resultados obtidos, é possível fornecer informação científica, de forma a permitir que o consumidor adquira uma opinião mais consistente à cerca destes novos produtos.

CAPÍTULO II





3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção e preparação das amostras

No presente estudo foram selecionadas amostras provenientes de duas categorias (lote normal e reserva) de quatro espécies utilizadas para preparação de infusão, sendo estas a *Aloysia tryphilla* (L'Herit.) Britton, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Mentha spicata* L. e *Thymus x citriodorus* (Pers.) Scherb., os lotes comercializados procedem da empresa Cantinho das Aromáticas sediada em Vila Nova de Gaia, Portugal.

Os lotes normal e reserva tem características que os distinguem, o lote reserva é constituído pelas partes mais jovens da planta colhidas nos meses mais quentes do verão, o que lhe confere características organolépticas diferenciadas (Rita, Pereira, Barros, Santos-Buelga, & Ferreira, 2016). A preparação das infusões foi realizada mediante as indicações disponíveis no rótulo, no que respeita à temperatura da água, tempo de extração, e concentração, excepto para *C. citratus*, cujas infusões foram concentradas de forma a realizar os ensaios.

3.2 Padrões e reagentes

O solvente acetonitrilo de grau HPLC e o ácido fórmico foram obtidos através da empresa LAB-SCAN analytical sciences (Gliwice, Polónia). Os padrões fenólicos foram fornecidos pela Extrasynthèse (Genay, França). O radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) foi obtido pela Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) é proveniente da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A água utilizada foi previamente tratada através do sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, USA).

3.3 Preparação dos extratos aquosos

As infusões foram preparadas tendo em conta as indicações do rótulo, como mencionado anteriormente. Foram pesados 300 mg, 300 mg, 900 mg e 300 mg de material seco de *A. citriodora*, *T. citriodorus*, *C. citratus* e *M. spicata*, respetivamente) por cada 100 mL de água destilada previamente aquecida a 90°, 85°, 90° e 90°C, e deixou-se repousar a temperatura ambiente por 7, 7, 5 e 5 minutos, respetivamente.



As infusões (soluções mãe) obtidas foram posteriormente submetidas a sucessivas diluições de modo a realizar os ensaios relativos à atividade antioxidante e também analisado o seu perfil fenólico (após filtragem a partir de filtros de nylon 0,2 μm).

3.4 Análise dos compostos fenólicos por HPLC-DAD-ESI/MSn

As infusões filtradas foram submetidas a análise cromatográfica através do sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) equipado com uma bomba quaternária, um injetor automático (a 5 °C), um degasificador e um compartimento de coluna com termóstato automatizado. A deteção dos compostos foi efetuada com detetor de díodos (DAD), usando os comprimentos de onda de 280 nm, 330 nm e 370 nm e acoplado a um detetor de espectrometria de massa (MS). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C₁₈ (3 μm , 4.6 mm \times 150 mm, Waters, Milford, MA, USA), a 35 °C. A fase móvel foi 0,1% de ácido fórmico em água (A) e acetonitrilo (B). O gradiente de eluição foi de 15% B (5 min), 15% B a 20% B (5 min), 20-25% B (10 min), 25-35% B (10 min), 35-50% B (10 min), e a coluna foi reequilibrada (10 min) utilizando um fluxo de 0,5 mL/min.

A deteção de MS foi realizada utilizando uma espectrómetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA), equipada com uma fonte de ionização *electrospray* (ESI). O gás de arraste utilizado foi azoto (50 psi); o sistema trabalhou com uma voltagem de *spray* de 5 kV, a uma temperatura inicial de 325 °C e tensão capilar de -20 V. A voltagem do *tube lens offset* foi mantida a -66 V. Os espetros foram gravados em modo de ião negativo entre 100 e 1500 *m/z*. A energia de colisão utilizada foi de 35 (unidades arbitrárias). Os dados foram recolhidos e analisados utilizando o programa Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA).

Os compostos foram identificados através da informação obtida (tempos de retenção, e espetros UV-VIS e massa) por comparação com compostos padrão, quando disponíveis, ou utilizando dados repostados na literatura. Para a quantificação foram obtidas curvas de calibração de compostos fenólicos padrão (Extrasynthèse, Genay, France), construídas com base no sinal UV de cada composto. As moléculas que não foram identificadas com padrões comerciais disponíveis, foram quantificados através da curva de calibração dos padrões mais similares. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/mL}$ de infusão.



3.5 Avaliação das propriedades antioxidantes através de métodos *in vitro*

3.5.1 Atividade captadora de radicais DPPH

Esta metodologia (**Figura 10**) foi realizada usando o leitor de microplacas ELX800 Reader (Bio-Tek Instruments, Inc.; Winooski, USA). A mistura de reação foi colocada na microplaca de 96 poços, esta continha as amostras (30 μ L) e solução metanólica (270 μ L) contendo radicais DPPH (6×10^{-5} mol/L). A mistura foi deixada em repouso por 60 minutos no escuro e a atividade captadora de radicais foi medida através da redução destes, a uma absorvância de 515 nm. A atividade captadora de radicais (ACR) foi calculada como percentagem de descoloração utilizando a equação:

$$\%RSA = [(Abs_{DPPH} - Abs_S) / Abs_{DPPH}] \times 100$$

Em que Abs_S é a absorvância da solução contendo a amostra, e Abs_{DPPH} é a absorvância da solução metanólica de DPPH

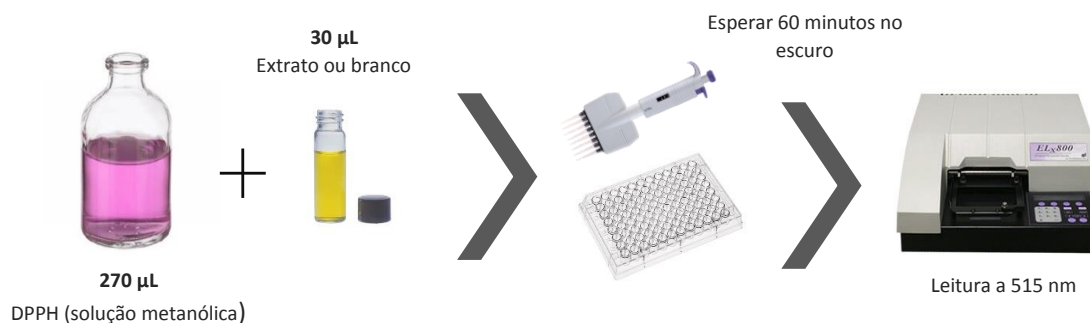


Figura 10. Representação esquemática do ensaio DPPH.

3.5.2 Poder Redutor

Neste ensaio (**Figura 11**) as diferentes soluções do extrato aquoso (0,5 mL) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/L, pH 6,6, 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1% *w/v*, 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C por 20 minutos, e foi adicionado ácido tricloroacético (10% *w/v*, 0,5 mL). A mistura (0,8 mL) foi colocada numa microplaca de 48 poços, juntamente com água desionizada (0,8 mL) e cloreto de ferro (0,1% *w/v*, 0,16 mL), e a absorvância foi medida a 690 nm no leitor de placas mencionado anteriormente.

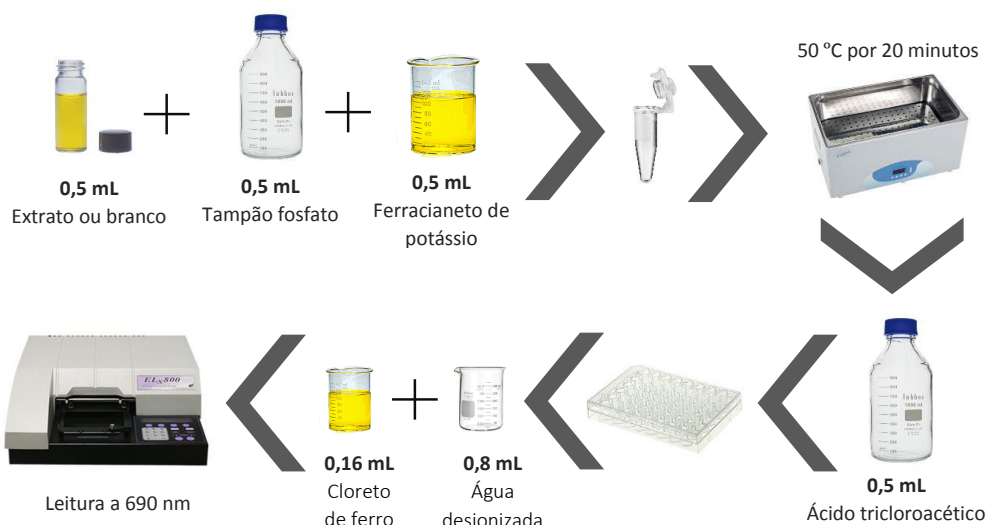


Figura 11. Representação esquemática do ensaio do poder redutor.

3.5.3 Inibição da descoloração do β -caroteno

A solução de β -caroteno (**Figura 12**) foi preparada através da dissolução desse mesmo composto (2 mg) em clorofórmio (10 mL). Num balão de fundo redondo foram transferidos 2 mL desta solução e posteriormente removeu-se o clorofórmio a 40 °C, sob vácuo. Sucessivamente juntou-se ácido linoleico (40 mg), emulsificante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL) e agitou-se vigorosamente, formando uma emulsão. Foram transferidos 4,8 mL dessa emulsão para tubos de ensaio, contendo diferentes concentrações dos extratos (0,2 mL). De seguida agitou-se cada tubo e efetuou-se a medição numa absorvância de 470 nm (espectrofotómetro AnalytikJena), considerando esta leitura o tempo zero. Posteriormente foram incubados num banho a 50 °C durante 2 h. Após o tempo determinado, foi novamente efetuada a medição dos tubos ao mesmo comprimento de onda, sendo designada tempo 2h. Preparou-se um branco contendo o solvente de extração (água). Através da seguinte equação foi possível calcular a inibição da descoloração do β -caroteno:

$$\text{Inibição da descoloração do } \beta\text{-caroteno} = [(A_{470} \text{ após } 2\text{h}/A_{470} \text{ inicial}) \times 100]$$

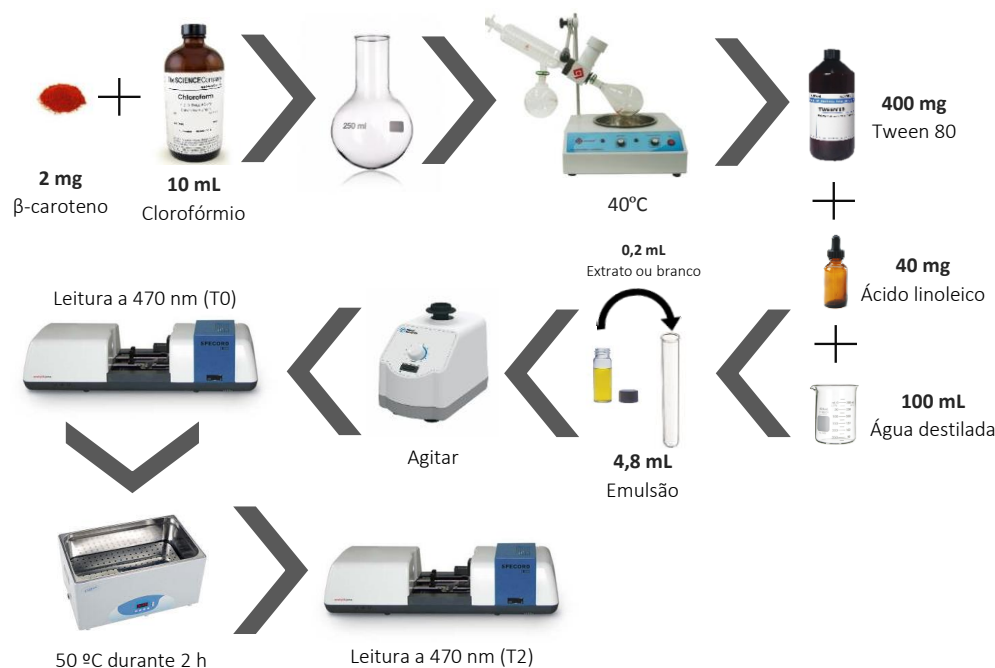


Figura 12. Representação esquemática do ensaio de inibição de descoloração do β -caroteno

3.5.4 Inibição da peroxidação lipídica através de produtos reativos do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para o ensaio TBARS (**Figura 13**) foram obtidos tecidos cerebrais de porco, a partir de animais oficialmente abatidos. Estes foram homogeneizados com Polytron em tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) para produzir uma porção de 1:2 (w/v) de homogeneizado cerebral, centrifugado a 3000g durante 10 minutos. Uma alíquota (100 μ L) do sobrenadante foi incubada com as soluções das amostras (200 μ L) na presença de FeSO₄ (10 mM; 100 μ L) e ácido ascórbico (0,1 mM; 100 μ L) a 37 °C por 1 h. A reação parou com a adição ácido tricloroacético (28% w/v, 500 μ L), seguido de ácido tiobarbitúrico (TBA, 2%, w/v, 380 μ L), e depois a mistura foi aquecida a 80 °C por 20 minutos. Após centrifugação a 3000g por 10 minutos para remover o precipitado proteico, a intensidade da cor do complexo malondialdeído (MDA) – TBA no sobrenadante foi medido pela sua absorvância a 532 nm. A inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$\text{Inibição da peroxidação lipídica (\%)} = [(A - B)/A] \times 100\%$$



Em que A e B representam a absorvância do controlo e da solução com o extrato, respetivamente.

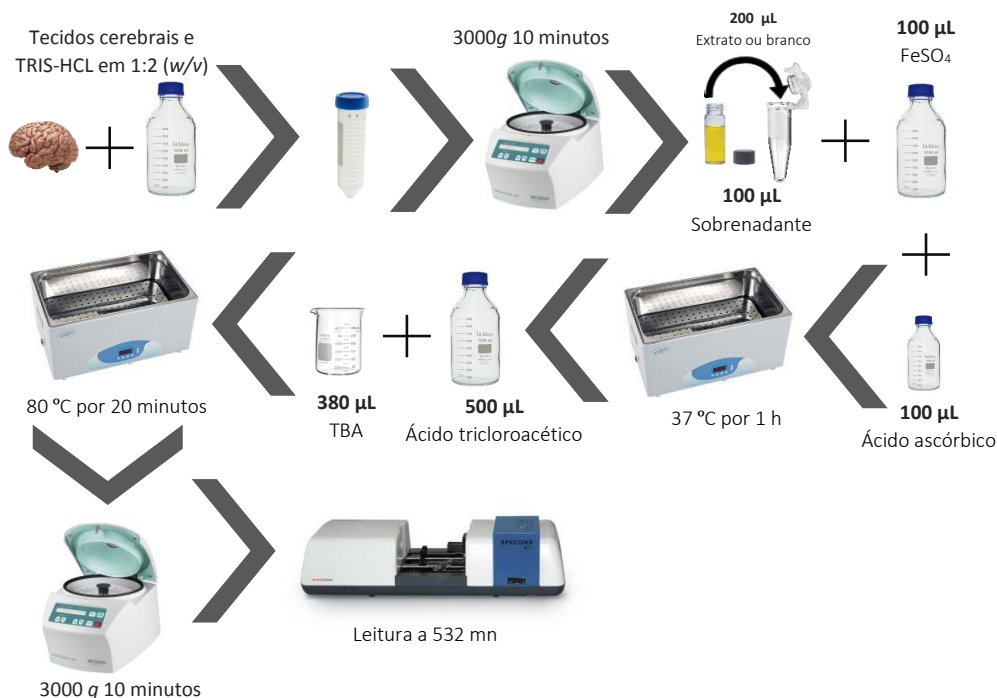


Figura 13. Representação esquemática do ensaio de inibição da peroxidação lipídica através de produtos reativos de ácido tiobarbitúrico.

3.6 Análise estatística

Os ensaios descritos foram realizados foram utilizadas três amostras e todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos como valores médios \pm desvio padrão correspondentes (SD). Os resultados foram analisados através do *teste-t Student* de forma a determinar as diferenças significativas entre duas amostras diferentes, com $p = 0.05$. Sempre que o *p-value* era inferior a 0.001, as diferenças significativas entre amostras eram consideradas. Para além disso foi realizado o teste de correlação de Pearson entre a atividade antioxidante e os compostos analisados, com um nível de confiança de 95%. Estes tratamentos estatísticos foram efetuados utilizando o programa SPSS v. 23.0.

CAPÍTULO III





4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram identificados individualmente a partir do seu tempo de retenção, espectros UV-VIS e MS e sempre que possível procedeu-se à comparação com os padrões disponíveis. As características obtidos pela análise por HPLC-DAD-ESI/MS de cada pico identificado (tempo de retenção, λ_{\max} , ião pseudomolecular, fragmentos iónicos principais em MS²), a identificação do composto fenólico, e as respetivas quantidades, das quatro espécies estudadas encontram-se nas **Tabelas 1 a 4**.

4.1.1 *Mentha spicata*

A **Figura 14** apresenta o perfil fenólico do extrato aquoso da *M. spicata* (lote reserva) obtido por infusão registado a 280 nm,. Os dados relativos ao tempo de retenção, absorvância (λ_{\max}), ião pseudomolecular, fragmentação molecular MS², e a tentativa de identificação dos compostos fenólicos, encontram-se representados na **Tabela 1**.

Os compostos 4, 6, 11 e 14 foram identificados positivamente como ácido cafeico, luteolina-7-*O*-rutinosido, ácido rosmarínico e luteolina-7-*O*-glucósido, respetivamente, por comparação com padrões comerciais. Com exceção da luteolina-7-*O*-rutinosido, todos os restantes compostos foram identificados previamente em diversos estudos relativos a esta espécie (Dorman, Kosar, Kahlos, Holm, & Hiltunen, 2003; Kivilompolo & Hyotylainen, 2007; Fatiha *et al.*, 2015).



Tabela 1. Tempo de retenção (Tr), comprimento de onda de absorvância máxima na região do visível (λ_{max}), informação dos espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos na infusão de *M. spicata*, lotes normal e reserva (média \pm SD).

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	Íão molecular [M-H] ⁺ (m/z)	Fragmentos maioritários MS ² (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação (µg/mL)		t-Students test p-value
						Normal	Reserva	
1 ^{Ms}	5,3	328	353	191(100),179(80), 173(6), 161(4), 135(28)	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	3,48 \pm 0,05	4,5 \pm 0,2	0,005
2 ^{Ms}	7,2	312	-	163(100), 119(50)	Derivado de ácido <i>p</i> -cumárico	2,45 \pm 0,03	6,13 \pm 0,07	<0,001
3 ^{Ms}	8,4	328	353	191(38), 179(75), 173(100), 161(5), 135(68)	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico	5,0 \pm 0,01	2,60 \pm 0,04	<0,001
4 ^{Ms}	11,3	326	179	135(100)	Ácido cafeico	1,6 \pm 0,2	4,5 \pm 0,2	<0,001
5 ^{Ms}	16,3	284, 336sh	595	287(100)	Eriodictiol- <i>O</i> -deoxi-hexosil-hexósido	0,96 \pm 0,05	6,7 \pm 0,3	<0,001
6 ^{Ms}	19,3	348	593	285(100)	Luteolina-7- <i>O</i> -rutinosido	5,2 \pm 0,1	8,6 \pm 0,5	0,003
7 ^{Ms}	20,1	348	461	285(100)	Luteolina- <i>O</i> -glucurónido	5,1 \pm 0,1	40,9 \pm 0,3	<0,001
8 ^{Ms}	21,1	284	719	359(71), 197(21), 179(14), 161(57), 135(7)	Ácido sangerínico	5,4 \pm 0,2	13,1 \pm 0,1	<0,001
9 ^{Ms}	21,8	284, 336sh	717	537(21), 529(54), 493(21), 339(24), 321(27), 313(9), 295(100), 277(18)	Ácido salvianólico E	13,3 \pm 0,4	9,8 \pm 0,1	<0,002
10 ^{Ms}	22,9	284, 336sh	609	301(100)	Hesperetina- <i>O</i> -deoxi-hexosil-hexósido	2,7 \pm 0,1	4,7 \pm 0,2	<0,001
11 ^{Ms}	23,9	330	359	197(50), 179(27), 161(100), 135(21)	Ácido rosmarínico	101 \pm 2	169 \pm 1	<0,001
12 ^{Ms}	24,4	326	493	313(12), 295(100), 197(11), 179(7), 161(17), 135(25)	Ácido isosalvianólico A	12,8 \pm 0,3	nd	-
13 ^{Ms}	25,6	348	607	299(100), 284(48)	Crisoeriol-7- <i>O</i> -rutinosido	10,6 \pm 0,3	16,2 \pm 0,4	<0,001
14 ^{Ms}	26,6	348	461	285(100)	Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido	3,5 \pm 0,1	6,9 \pm 0,2	<0,001
15 ^{Ms}	27,6	289, 330sh	717	519(95), 339(13), 321(100), 295(22), 277(7)	Ácido salvianólico B	7,8 \pm 0,4	16,2 \pm 0,3	<0,001
16 ^{Ms}	27,9	289, 332sh	717	519(100), 339(27), 321(87), 295(13), 277(33)	Ácido salvianólico I	6,2 \pm 0,4	nd	-
17 ^{Ms}	31,1	324	493	359(48), 313(5), 295(4), 197(15), 179(19), 161(100), 135(4)	Ácido salvianólico A	4,4 \pm 0,3	21,6 \pm 0,2	<0,001
Ácidos fenólicos totais						164 \pm 3	248 \pm 1	<0,001
Flavonóides totais						28,0 \pm 0,3	84 \pm 1	<0,001
Compostos fenólicos totais						191 \pm 3	332 \pm 1	<0,001

nd – não detetado; Curvas de calibração padrão: composto 1^{Ms} e 3^{Ms} - ácido clorogénico ($y=304,25x-248,06$); composto 2^{Ms} - ácido *p*-coumarico ($y=706,09x+1228,1$); composto 4^{Ms} - ácido cafeico ($y=359x+488,4$); composto 5^{Ms} - eriodictiol ($y=224,31x+148,41$); compostos 6^{Ms}, 7^{Ms} e 13^{Ms} - luteolina-7-*O*-rutinosido ($y=334,2x-261,39$); compostos 8^{Ms}, 9^{Ms}, 11^{Ms}, 12^{Ms}, 15^{Ms}, 16^{Ms} e 17^{Ms} - ácido rosmarínico ($y= 312,2x-424,06$); composto 10^{Ms} - hesperetina ($y=792,22x-76,883$); composto 14^{Ms} - luteína-7-*O*- glucósido ($y=334,2x-261,39$).

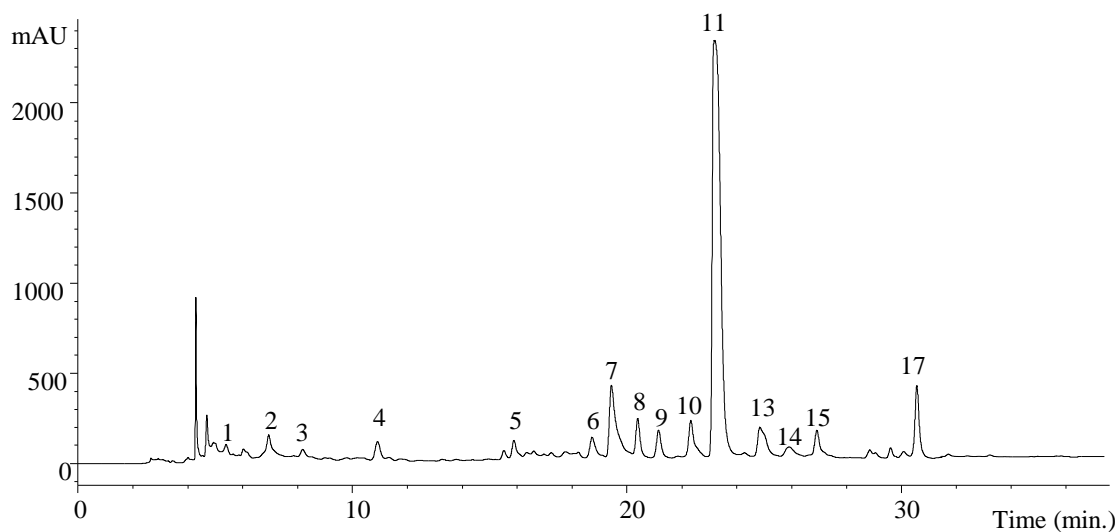


Figura 14. Perfil fenólico do extrato aquoso do lote reserva de *M. spicata*, preparado por infusão, registado a 280 nm. Todos os números apresentados no cromatograma correspondem aos compostos identificados na Tabela 1.

O composto 1 ($[M - H]^-$ a m/z 353) foi identificado como sendo o ácido 3-*O*-cafeoilquínico com base na sua fragmentação MS^2 , originando um pico base em m/z 191 e um ião em m/z 179 com uma intensidade de 80% relativamente ao pico base, considerando as características do ácido 3-acilclorogénico (Clifford, Knight & Kuhnert, 2005). O composto 3 foi facilmente caracterizado pelo seu pico base a m/z 173 [ácido quínico - H - H₂O]⁻, acompanhado pelo fragmento do seu ião secundário em m/z 179 com aproximadamente 75% de abundância do pico base, o que permitiu identificá-lo como ácido 4-*O*-cafeoilquínico de acordo com o padrão de fragmentação descrito por Clifford, Knight, & Kuhnert (2005). Estes compostos, até o melhor do nosso conhecimento, ainda não foram descritos em *M. spicata*, embora muitos trabalhos (Kivilompolo & Hyotylainen, 2007; Benedec *et al.*, 2013; Scherer *et al.*, 2013; Moldovan *et al.*, 2014; Fatiha *et al.*, 2015) descrevessem a presença de ácido clorogénico nesta espécie, mas sem indicar especificamente qual a posição do ácido quínico, ou seja, sem distinguir qual o ácido cafeoilquínico identificado.

O composto 2 apresenta um espectro UV e um padrão de fragmentação similar ao ácido *p*-cumárico. A presença deste ácido foi descrito anteriormente nesta espécie por diferentes autores (Kivilompolo & Hyotylainen, 2007; Benedec *et al.*, 2013; Moldovan *et al.*, 2014; Fatiha *et al.*, 2015), embora essa identidade tenha sido descartada no nosso



caso, uma vez que o composto detetado eluiu mais cedo do que o padrão de ácido *p*-cumárico. Por conseguinte, o pico 2 foi apenas identificado tentativamente como sendo um derivado do ácido *p*-cumárico.

Os compostos 8, 9, 12, 15, 16 e 17 foram identificados como derivados hidroxicinamoil, denominados por oligómeros do ácido cafeico.

O composto 8 apresentou um ião pseudomolecular $[M - H]^-$ a m/z 719 e apresentou um único fragmento em MS^2 a m/z 359 correspondente a $[M - 2H]^{2-}$; estas características de massa coincidem com as do ácido sangerínico, um dímero do ácido rosmarínico descrito por nós anteriormente numa planta da família Lamiaceae (Barros *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2015a) Os compostos 12 e 17 apresentam o mesmo ião pseudomolecular $[M - H]^-$ a m/z 493, com um padrão de fragmentação em MS^2 de m/z 313, 295 e 197, e espectro UV-vis, característico de isómeros do ácido salvianólico (Chen, Zhang, Wang, Yang, & Wang, 2011; Ruan, Li, Li, Luo, & Kong, 2012). Com base na sua ordem relativa de eluição, descrita por Ruan, Li, Li, Luo, & Kong (2012), estes compostos foram identificados tentativamente como ácido isosalvianólico A e ácido salvianólico A, respetivamente. Os compostos 9, 15 e 16 apresentam o mesmo ião pseudomolecular ($[M-H]^-$ em m/z 717) e um padrão de fragmentação que consistiu por perdas sucessivas de 198 u (ácido 3-(3,4-di-hidroxifenil)lático, “danshensu”) ou 180 u (ácido cafeico). Estas características podem coincidir com as identidades do ácido salvianólico B (também conhecido por ácido litoespérmico B), E ou L. O ácido salvianólico B contém um anel furano na sua estrutura que está ausente nos ácidos salvianólicos E ou L (Ruan, Li, Li, Luo, & Kong, 2012). De acordo com Liu *et al.* (2007), o ácido salvianólico B estaria mais propenso a perder uma unidade de “danshensu” (- 198 u), devido à facilidade do mesmo em perder o carboxilo ligado ao anel furano, deste modo o pico 9 apresentou uma menor abundância no fragmento em m/z 519 (-198) do que nos picos 15 e 16; assim, este não deveria corresponder ao ácido salvianólico B. Desta forma, e com base na ordem de eluição relativa descrita para estes compostos pelos mesmos autores, os compostos 9, 15 e 16 poderiam ser identificados tentativamente como ácidos salvianólicos E, B e L. De acordo com o nosso conhecimento, todos estes oligómeros de cafeoil foram descritos pela primeira vez em *M. spicata*.

Os restantes quatro compostos correspondem a flavonoides. Os espectros UV-VIS dos compostos 5 ($[M - H]^-$ em m/z 595) e 10 ($[M - H]^-$ em m/z 609) sugerem que se tratam



de flavanonas. Em ambos os casos, apenas um único fragmento de MS^2 foi liberto, correspondendo a uma perda de um desoxi-hexosil-hexósido (-308 u) com uma perda aos fragmentos em m/z 287 ([eriodictiol-H] $^-$) e 301 ([hesperetina-H] $^-$), de modo que estes compostos foram identificados tentativamente como eriodictiol-*O*-desoxi-hexosil-hexósido e hesperetina-*O*-desoxi-hexosil-hexósido, respetivamente. O eriocitrina (eriodictiol-7-*O*-glucósido) e o eriodictiol, já foram descritos anteriormente em extratos hidrossolúveis de *Mentha*, (Dorman, Kosar, Kahlos, Holm, & Hiltunen, 2003), mas os glucósidos de hesperetina, ainda não tinham sido descritos nesta espécie.

O composto 7 apresentou um ião pseudomolecular $[M - H]^-$ em m/z 461 libertando um ião de fragmentação a m/z 285 ($[M - 176]^-$, perda de um glucuronil), permitindo a sua identificação tentativa como luteolina-*O*-glucurónido. O composto 13 ($[M - H]^-$ em m/z 607), produziu um fragmento em m/z 299 (-308 u; com a perda de um resíduo de desoxi-hexosil-hexósido), permitindo a sua identificação como crisoeriol-7-*O*-rutinósido, tendo em conta a sua identificação prévia noutras espécies de *Mentha*, nomeadamente o híbrido *Mentha* \times *villosa* (Fialovaa *et al.*, 2015). A presença de luteolina-7-*O*-glucósido e de luteolina já foi referida anteriormente em *M. spicata*, (Mandana *et al.*, 2012; Dorman, Kosar, Kahlos, Holm, & Hiltunen, 2003; Benedec *et al.*, 2013; Fatiha *et al.*, 2015; Moldovan *et al.*, 2014), embora os dois compostos aqui detetados, ainda não tivessem sido descritos em *M. spicata*.

O lote de reserva de *M. spicata* apresentou uma maior concentração de todos os compostos identificados em relação ao lote normal (**Tabela 1**), e em ambas as amostras o ácido rosmarínico é apresentado como sendo o composto fenólico mais abundante. Para além disso, os compostos 12 (ácido isosalvianólico A) e 16 (ácido salvianólico L) não foram detetados no lote de reserva.

4.1.2 *Cymbopogon citratus*

Relativamente à espécie de *C. citratus*, é possível observar o perfil fenólico do extrato aquoso, obtido por infusão do lote de reserva, registado a 370 nm na **Figura 15**.

Os lotes normais e de reserva revelaram perfis fenólicos similares, em termos dos compostos detetados, no entanto o lote de reserva apresentou concentrações significativamente superiores em comparação com o lote normal, com um conteúdo total



de compostos fenólicos de 88 e 12,3 $\mu\text{g/mL}$ (**Tabela 2**), respetivamente. Os flavonoides foram os compostos predominantes em ambos os lotes, com elevadas concentrações de luteolina 2''-*O*-deoxi-hexosil-6-*C*-glucósido e luteolina-6-*C*-pentosil-8-*C*-pentósido, mas o composto mais abundante em ambos os lotes foi o ácido 5-*O*-cafeoilquínico.

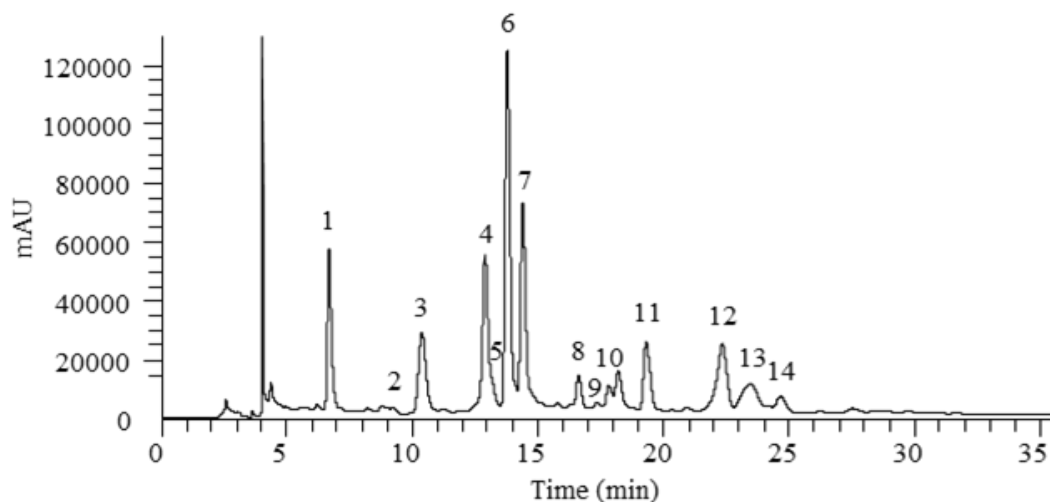


Figura 15. Perfil fenólico do extrato aquoso do lote reserva de *C. citratus*, preparado por infusão, registado a 370 nm. Todos os números apresentados no cromatograma correspondem aos compostos identificados na **Tabela 2**.

Todos os compostos identificados (**Tabela 2**) em *C. citratus* já tinha sido previamente descritos pelo nosso grupo de investigação (Roriz, Barros, Carvalho, Santos-Buelga, & Ferreira, 2014), em que o flavonoide maioritário encontrado foi, também, a luteolina 2''-*O*-deoxi-hexosil-6-*C*-glucósido mas, contrariamente aos resultados obtidos no presente estudo, em concentrações mais altas que o ácido 5-*O*-cafeoilquínico. Esta variação pode ser atribuída às diferentes condições de colheita, devido ao facto de que os ácidos hidroxicinâmicos aparecerem entre os compostos que apresentam uma maior variabilidade durante os meses de primavera-verão (Costa, Grangeia, Figueirinha, Figueiredo, & Batista, 2016).



Tabela 2. Tempo de retenção (Tr), comprimento de onda de absorvância máxima na região do visível (λ_{max}), informação dos espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos na infusão de *C. citratus*, lotes normal e reserva (média \pm SD).

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	Íão molecular [M-H] ⁺ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação (µg/mL)		Valor de p teste t-Student
						Normal	Reserva	
1 ^{Cc}	6,70	324	353	191(100),179(4),161(5),135(3)	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	3,87 \pm 0,05	23,3 \pm 0,2	<0,001
2 ^{Cc}	9,23	326	179	135(100)	Ácido cafeico	1,13 \pm 0,01	2,88 \pm 0,03	<0,001
3 ^{Cc}	10,38	350	579	561(10),519(6),489(56),459(100),399(52),369(47)	Luteolina 6- <i>C</i> -hexosil-8- <i>C</i> -pentósido	0,58 \pm 0,06	5,610 \pm 0,003	<0,001
4 ^{Cc}	12,88	336	563	545(27),503(40),473(100),443(83),383(90),353(85)	Apigenina 6- <i>C</i> -pentosil-8- <i>C</i> -hexósido	1,2 \pm 0,1	7,63 \pm 0,08	<0,001
5 ^{Cc}	12,97	336	563	545(20),503(37),473(100),443(83),383(73),353(83)	Apigenina 6- <i>C</i> -pentosil-8- <i>C</i> -hexósido	tr	1,1 \pm 0,2	<0,001
6 ^{Cc}	13,78	350	593	473(100),429(37),357(26),339(12), 309(20),(35)	Luteolina 2''- <i>O</i> -deoxi-hexosil-6- <i>C</i> -glucósido	1,78 \pm 0,09	15,7 \pm 0,1	<0,001
7 ^{Cc}	14,40	350	549	531(18),489(36),459(100),441(25),429(21),399(55),369(52)	Luteolina 6- <i>C</i> -pentosil-8- <i>C</i> -pentósido	2,02 \pm 0,07	9,7 \pm 0,2	<0,001
8 ^{Cc}	16,60	344	577	457(26),413(100),341(15),311(14),293(77)	Apigenina 2''- <i>O</i> -deoxi-hexosil- <i>C</i> -hexósido	0,0010 \pm 0,0001	1,8 \pm 0,1	<0,001
9 ^{Cc}	17,36	352	563	503(3),473(100),417(17),399(53),357(23),327(25),298(40)	Luteolina 2''- <i>O</i> -deoxi-hexosil- <i>C</i> -pentósido	tr	1,22 \pm 0,03	-
10 ^{Cc}	17,80	350	593	447(6),285(22)	Luteolina 7- <i>O</i> -neohesperósido	tr	2,26 \pm 0,05	-
11 ^{Cc}	19,29	352	563	503(3),473(100),417(17),399(53),357(23),327(25),298(40)	Luteolina 2''- <i>O</i> -deoxi-hexosil- <i>C</i> -pentósido	0,160 \pm 0,001	4,22 \pm 0,02	<0,001
12 ^{Cc}	22,34	350	575	531(33),429(38),411(100),367(65),357(15),337(20),309(10)	Luteolina 2''- <i>O</i> -deoxiosil- <i>C</i> -(6-deoxi-pento-hexos-ulosil)	1,13 \pm 0,03	6,52 \pm 0,07	<0,001
13 ^{Cc}	23,38	350	575	531(33),429(38),411(100),367(65),357(15),337(20),309(10)	Luteolina 2''- <i>O</i> -deoxiosil- <i>C</i> -(6-deoxi-pento-hexos-ulosil)	0,44 \pm 0,01	4,3 \pm 0,1	<0,001
14 ^{Cc}	24,60	350	577	487(10),473(40),413(100),371(15),323(27)	Metilluteolina 2''- <i>O</i> - deoxi-hexosil-6- <i>C</i> -hexósido.	tr	1,60 \pm 0,07	-
Ácidos fenólicos totais						5,00 \pm 0,06	26,2 \pm 0,2	<0,001
Flavonoides totais						7,3 \pm 0,4	62 \pm 1	<0,001
Compostos fenólicos totais						12,3 \pm 0,5	88 \pm 1	<0,001

tr- vestígios; curvas de calibração padrão: compostos 1^{Cc} e 2^{Cc}, - ácido clorogénico ($y = 168823x - 161172$); composto 3^{Cc} a 14^{Cc} - apigenina-6-*C*-glucósido ($y = 4087,1x + 72589$).



4.1.3 *Aloysia citriodora*

Na **Figura 16** é possível observar o perfil fenólico do extrato aquoso do lote reserva de *A. citriodora*, preparado por infusão e registado a 280 nm.

Também neste caso, o lote reserva (230 $\mu\text{g/mL}$) apresentou concentrações superiores de compostos fenólicos que o lote normal (182 $\mu\text{g/mL}$) (**Tabela 3**). O ácido *p*-cumárico foi o único ácido fenólico detetado nos lotes normal e de reserva, com concentrações de 1,65 e 1,91 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente.

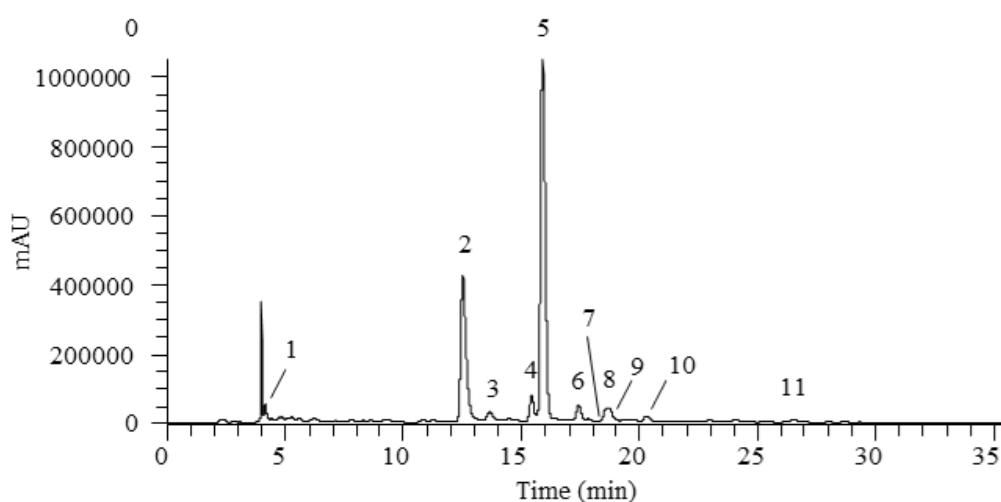


Figura 16. Perfil fenólico do extrato aquoso do lote reserva de *A. citriodora*, preparado por infusão, registado a 280 nm. Todos os números apresentados no cromatograma correspondem aos compostos identificados na **Tabela 3**.

Os flavonoides e os derivados de cafeoil feniletanóide estão presentes em concentrações similares em ambos os lotes, mas em concentrações sensivelmente superiores no lote reserva.

Todos os compostos identificados (**Tabela 3**) coincidem com as amostras estudadas anteriormente (Pereira *et al.*, 2017b), sendo a luteolina-7-*O*-diglucurónido e o verbascósido os compostos maioritários identificados.



Tabela 3. Tempo de retenção (Tr), comprimento de onda de absorvância máxima na região do visível (λ_{max}), informação dos espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos na infusão de *A. citriodora*, lotes normal e reserva(média \pm SD).

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	Ião molecular [M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação (µg/mL)		Valor de p teste t-Student
						Normal	Reserva	
1 ^{Ac}	4,18	280	461	315(8),135(28)	Verbasósido	3,1 \pm 0,1	3,91 \pm 0,10	<0,001
2 ^{Ac}	12,54	344	637	351(100),285(89)	Luteolina-7-O-diglucurónio	67,7 \pm 0,5	87,70 \pm 1,02	<0,001
3 ^{Ac}	13,68	314	163	119(100)	Ácido p-cumárico	1,65 \pm 0,04	1,91 \pm 0,04	<0,001
4 ^{Ac}	15,44	338	621	351(100),269(20)	Apigenina-7-O-diglucurónio	8,04 \pm 0,06	9,99 \pm 0,08	<0,001
5 ^{Ac}	15,90	330	623	461(18), 315(5)	Verbascósido	73 \pm 1	93 \pm 1	<0,001
6 ^{Ac}	17,42	350	651	351(100), 299(5)	Crisoeriol-7-O-diglucurónio	12,6 \pm 0,2	11,1 \pm 0,1	<0,001
7 ^{Ac}	18,60	330	623	461(18), 315(5)	Isoverbascósido	2,6 \pm 0,01	4,4 \pm 0,1	<0,001
8 ^{Ac}	18,68	330	623	461(15), 315(10)	Forsitosído	2,46 \pm 0,01	4,50 \pm 0,03	<0,001
9 ^{Ac}	18,79	350	491	315(100),300(23)	Isoramnetina-7-O-glucurónio	5,65 \pm 0,03	7,70 \pm 0,04	<0,001
10 ^{Ac}	20,29	330	637	491(5),461(60), 315(13)	Eucovósido	2,6 \pm 0,2	3,37 \pm 0,05	<0,001
11 ^{Ac}	26,52	330	651	505(7),475(22)	Martinósido	2,14 \pm 0,05	2,59 \pm 0,04	<0,001
Derivados de cafeoil feniletanóide totais						86,1 \pm 1	112 \pm 2	<0,001
Ácidos fenólicos totais						1,65 \pm 0,04	1,91 \pm 0,04	<0,001
Flavonoides totais						94,0 \pm 0,8	117 \pm 1	<0,001
Compostos fenólicos totais						182 \pm 2	230 \pm 3	<0,001

Curvas de calibração padrão: compostos 1^{Ac}, 5^{Ac}, 7^{Ac}, 8^{Ac}, 10^{Ac} e 11^{Ac} - ácido clorogénico ($y = 388345x + 406369$); composto 2^{Ac}, 4^{Ac}, 6^{Ac}, 9^{Ac} - apigenina-7-O-glucósido ($y = 10683x - 45794$); composto 3^{Ac} - ácido p-cumárico ($y = 301950x + 6966,7$).



No estudo de Pereira, *et al.* (2017b), as infusões revelaram maiores concentrações de derivados cafeoil feniletanóide totais (146,0 $\mu\text{g/mL}$) que os dois lotes estudados (86,1 e 112 $\mu\text{g/mL}$ para lote normal e reserva, respetivamente), tendo apresentado também uma maior concentração de compostos fenólicos totais (241,04 $\mu\text{g/mL}$). O nosso grupo de investigação também estudou os extratos hidrometanólicos desta planta, obtendo o mesmo perfil fenólico e os compostos mais abundantes também foram os mesmos (Pereira *et al.*, 2017a).

4.1.4 *Thymus citriodorus*

O perfil fenólico do extrato aquoso do lote normal de *T. citriodorus*, preparado por infusão, registado a 280 nm encontra-se representado na **Figura 17**.

Contrariamente aos resultados obtidos em *M. spicata*, *C. citratus* e *A. citriodora*, a infusão preparada a partir do lote normal de *T. citriodorus* revelou concentrações de compostos fenólicos ligeiramente superiores aos obtidos a partir dos lotes reserva, com um total de 170 e 154 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente (**Tabela 4**).

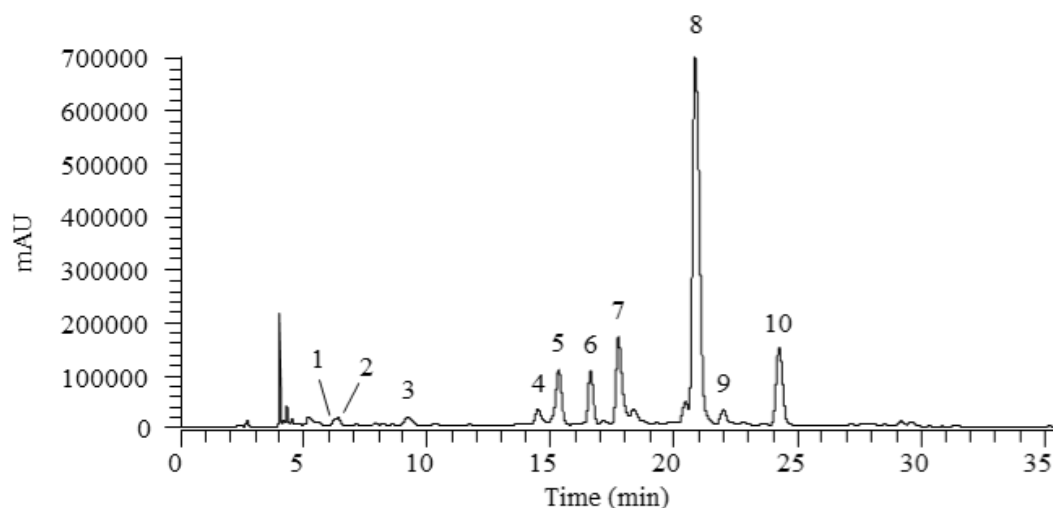


Figura 17. Perfil fenólico do extrato aquoso do lote normal de *T. citriodorus*, preparado por infusão, registado a 280 nm. Todos os números apresentados no cromatograma correspondem aos compostos identificados na **Tabela 4**.

Ambos os lotes apresentaram prevalência de ácidos fenólicos (111 e 92 $\mu\text{g/mL}$ nos lotes normal e reserva, respetivamente), sendo o ácido rosmariníco o mais abundante, seguido do ácido litospérmico A e o hexóxido de ácido rosmarínico.



Tabela 4. Tempo de retenção (Tr), comprimento de onda de absorvância máxima na região do visível (λ_{\max}), informação dos espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos na infusão de *Thymus* × *citriodorus*, lotes normal e reserva (média ± SD).

Pico	Tr (min)	λ_{\max} (nm)	Íão molecular [M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação (µg/mL)		Valor de p teste t-Student
						Normal	Reserva	
1 ^{Tc}	6,24	320	341	179(100),135(88)	Hexósido de ácido cafeico	2,09 ± 0,04	2,69 ± 0,04	<0,001
2 ^{Tc}	6,38	282,327	611	449(100),287(14)	Eriodictiol-O-dihexósido	tr	tr	-
3 ^{Tc}	9,13	338	593	473(20),383(33),353(27),297(5)	Apigenina-6,8-di-C-glucósido	0,44 ± 0,07	1,05 ± 0,06	<0,001
4 ^{Tc}	14,50	340	477	301(100)	Quercetina-O-glucurónido	5,68 ± 0,02	5,65 ± 0,03	0,242
5 ^{Tc}	15,33	285,331	463	287(100)	Eriodictiol-O-glucurónido	6,17 ± 0,09	5,3 ± 0,1	<0,001
6 ^{Tc}	16,60	322	521	359(100),197(13),179(36),161(62),135(21)	Hexósido de ácido rosmarínico	11,7 ± 0,3	4,24 ± 0,06	<0,001
7 ^{Tc}	17,74	348	461	285(100)	Luteolina-7-O-glucurónido	39 ± 1	41,2 ± 0,9	0,018
8 ^{Tc}	20,85	330	359	197(17),179(35),161(100),135(29)	Ácido rosmarínico	78 ± 2	66 ± 2	<0,001
9 ^{Tc}	21,99	336	445	269(100)	Apigenina-7-O-glucurónido	7,53 ± 0,01	9,2 ± 0,2	<0,001
10 ^{Tc}	24,25	290,326sh	537	493(50),359(17),295(33),179(75),135(100)	Ácido litospermíco A	19,4 ± 0,6	18,8 ± 0,7	0,138
Ácidos fenólicos totais						111 ± 3	92 ± 2	<0,001
Flavonoides totais						59 ± 1	62 ± 1	0,008
Compostos fenólicos totais						170 ± 4	154 ± 4	0,002

tr- vestígios; Curvas de calibração padrão: composto 1^{Tc} - ácido clorogénico ($y = 168823x - 161172$); compostos 2^{Tc} e 5^{Tc} - naringenina ($y = 18433x + 78903$); composto 3^{Tc} - apigenina-6-C-glucosido ($y = 4087,1x + 72589$); composto 4^{Tc} - quercetina-3-O-glucósido ($y = 34843x - 160173$); composto 6^{Tc}, 8^{Tc} e 10^{Tc} - ácido rosmarínico ($y = 191291x - 652903$); composto 7^{Tc} e 9^{Tc} - apigenina-7-O-glucósido ($y = 10683x - 45794$).



Em relação aos flavonoides, os compostos maioritários identificados foram a luteolina-7-*O*-glucurónido, apigenina-7-*O*-glucurónido, eriodictiol-*O*-glucurónido, e quercetina-*O*-glucurónido. Os compostos detetados nestas amostras (**Tabela 4**) foram previamente identificadas pelo nosso grupo de investigação em infusões, decocções, e extratos hidroalcológicos e metanólicos de *Thymus vulgaris* L. (Martins, Barros, Santos-Buelga, Silva, & Henriques, 2015b; Pereira *et al.*, 2016a; Pereira *et al.*, 2016b).

Em geral, a luteolina-7-*O*-glucurónido e o ácido rosmarínico foram os compostos mais abundantes nos dois lotes estudados.

4.2 Atividade antioxidante

Os resultados da atividade antioxidante obtidos nos lotes normal e reserva de *M. spicata*, *C. citratus*, *A. citriodora*, e *T. citriodorus*, expressos em valores EC_{50} , estão presentes na **Tabela 5**. O lote reserva (0,152 a 0,336 mg/mL) de *M. spicata* revelou uma atividade antioxidante superior ao lote normal (0,173 a 0,546 mg/mL), apresentando valores de EC_{50} mais baixos em todos os ensaios. Ambos os lotes revelaram melhores resultados no ensaio de inibição de peroxidação lipídica (TBARS), seguido dos ensaios de poder redutor e de atividade captadora de radicais DPPH. Em ensaios levados a cabo por outros autores, o extrato aquoso de *M. spicata* revelou um valor de EC_{50} de 65,2 μ g/mL (Dorman, Kosar, Kahlos, Holm, & Hiltunen, 2003) e o seu extrato etanólico apresentou um valor de EC_{50} de 16,2 μ g/mL (Fatiha *et al.*, 2015) no ensaio DPPH. Mata *et al.* (2007) descreveram valores de atividade captadora de DPPH de extratos aquoso e etanólico obtidos a partir desta planta, com valores de EC_{50} de 5,7 e 65,2 μ g/mL, respetivamente. Em todos os casos, os valores da atividade antioxidante foram superiores aos obtidos no nosso estudo, o que poderá estar relacionado com os diferentes solventes utilizados e as condições de extração aplicadas.

A maior capacidade antioxidante das infusões de *M. spicata* foi encontrada no lote de reserva, podendo estar relacionado com a concentração mais elevada de compostos fenólicos encontrada nesta amostra, estando desta forma em concordância com a bioatividade bem conhecida destes compostos.



Tabela 5. Atividade antioxidante das infusões elaboradas a partir dos lotes normal e reserva das espécies *M. spicata*, *C. citratus*, *A. citriodora* e *T. citriodorus*, expressas em valores de EC₅₀ (mg/mL).

		Poder redutor		Atividade captadora de radicais		Inibição da peroxidação lipídica
		Ferricianeto/Azul da Prússia	Atividade captadora DPPH	β-caroteno/linoleato	TBARS	
<i>M. spicata</i>	lote normal	0,301 ± 0,03	0,546 ± 0,017	-	0,173 ± 0,05	
	lote reserva	0,198 ± 0,02	0,336 ± 0,03	-	0,152 ± 0,05	
Valor de <i>p</i> teste <i>t</i> -Student		<0,001	<0,001	-	<0,001	
<i>C. citratus</i>	lote normal	2,33 ± 0,05	3,49 ± 0,03	3,66 ± 0,09	0,75 ± 0,03	
	lote reserva	1,01 ± 0,01	1,43 ± 0,06	2,01 ± 0,03	0,37 ± 0,01	
Valor de <i>p</i> teste <i>t</i> -Student		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
<i>A. citriodora</i>	lote normal	0,205 ± 0,001	0,39 ± 0,05	0,93 ± 0,02	0,082 ± 0,001	
	lote reserva	0,169 ± 0,001	0,25 ± 0,01	0,92 ± 0,01	0,088 ± 0,001	
Valor de <i>p</i> teste <i>t</i> -Student		<0,001	0,013	0,350	0,002	
<i>T. citriodorus</i>	lote normal	0,228 ± 0,003	0,34 ± 0,01	1,01 ± 0,06	0,118 ± 0,001	
	lote reserva	0,393 ± 0,002	0,32 ± 0,02	0,73 ± 0,03	0,117 ± 0,001	
Valor de <i>p</i> teste <i>t</i> -Student		<0,001	0,251	0,035	0,112	

Trolox valores EC₅₀: 41 µg/mL (Poder redutor), 42 µg/mL (Atividade captadora de radicais DPPH), 18 µg/mL (Inibição de descoloração do β-caroteno) e 23 µg/mL (Inibição TBARS).



O lote reserva de *C. citratus* (0,37 – 2,01 mg/mL) revelou maior atividade antioxidante que o lote normal (0,75 – 3,66 mg/mL), com valores EC_{50} inferiores nos quatro ensaios realizados, no qual está de acordo com a sua concentração elevada de compostos fenólicos. Em relação aos lotes de *A. citriodora*, as diferenças entre os resultados obtidos nos quatro ensaios não foram estatisticamente significativas à exceção do ensaio do poder redutor, em que o lote reserva exibiu melhores resultados (valores de EC_{50} de 0,169 e 0,205 mg/mL para os lotes reserva e normal, respetivamente), que pode ser explicado pela sua concentração elevada em compostos fenólicos.

Da mesma forma, na atividade antioxidante das infusões de *T. citriodorus*, obteve-se um resultado semelhante entre os dois lotes, à exceção do ensaio de poder redutor, em que o lote normal revelou uma maior atividade (valores EC_{50} de 0,228 e 0,393 mg/mL no lote normal e reserva, respetivamente), o que poderia ser também explicado pela sua maior concentração em compostos fenólicos.

Os fatores de correlação entre os ensaios de atividade antioxidante e os compostos fenólicos foram obtidos a partir da análise do coeficiente de correlação de Pearson, após verificar a normalidade através do teste não-paramétrico Shapiro-Wilk. Os compostos fenólicos encontrados nas infusões de *M. spicata* demonstraram estar estatisticamente correlacionada com todos os métodos de atividade antioxidante, sendo mais evidente no ensaio de TBARS para todos os compostos totais analisados ($R^2=-0,896$, p -values = 0,019).

Em relação às infusões de *C. citratus*, as correlações estatisticamente significativas foram obtidas a partir do teor de compostos fenólicos totais e o valor de EC_{50} obtido através dos ensaios da atividade captadora de radicais DPPH ($R^2=-0,886$, p -values = 0,019) e poder redutor ($R^2=-0,999$, p -values \leq 0,001); por outro lado, baixas correlações foram obtidas para o ensaio de inibição da peroxidação lipídica através do sistema β -caroteno linoleato ($R^2=-0,600$, p -values = 0,208) e pelo ensaio de TBARS ($R^2=-0,771$, p -values = 0,072).

A capacidade antioxidante das infusões de *A. citriodora* revelou estar significativamente relacionada com a concentração dos compostos fenólicos totais em relação a atividade captadora de radicais DPPH ($R^2=-0,892$, p -values = 0,017), poder redutor ($R^2=-0,997$, p -values <0,001), e ensaio TBARS ($R^2=-0,946$, p -values = 0,004), à



exceção do ensaio de inibição da descoloração do β -caroteno ($R^2=-0,475$, p -values = 0,341).

Em relação às infusões de *T. citriodorus*, a concentração total de compostos fenólicos está bastante correlacionada com os ensaios do poder reductor ($R^2=-0,959$, p -values = 0,003), ensaio de inibição da descoloração do β -caroteno ($R^2=-0,880$, p -values = 0,021), enquanto para o ensaio TBARS ($R^2=-0,650$, p -values = 0,162) foram obtidos fatores de correlação inferiores. A atividade captadora de radicais DPPH ($R^2=-0,422$, p -values = 0,405) não está correlacionada com os compostos fenólicos, podendo significar que outros compostos (e.g. triterpenóides, vitaminas e outros compostos orgânicos), podem estar relacionados ao efeito captador de radicais revelado por esta espécie.

Em geral, as amostras que apresentam uma concentração mais elevada de compostos fenólicos também revelam uma atividade antioxidante mais elevada.

As infusões preparadas a partir dos lotes de reserva de *M. spicata*, *C. citratus* e *A. citriodora* revelam teores mais elevados de ácidos fenólicos totais e flavonoides totais, do que os obtidos a partir dos lotes normais. No caso das infusões de *T. citriodorus*, os lotes normal e reserva não revelaram diferenças significativas em relação aos flavonoides totais e compostos fenólicos totais.

CAPÍTULO IV





CONCLUSÕES

As infusões preparadas a partir dos lotes de reserva de *M. spicata*, *C. citratus* e *A. citriodora* revelaram teores mais elevados de ácidos fenólicos totais e flavonoides, do que os obtidos a partir dos lotes normais, à exceção das infusões de *T. citriodorus*, no qual os lotes normal e reserva não revelaram diferenças significativas em relação aos flavonoides totais e compostos fenólicos totais.

O lote de reserva de *M. spicata* apresentou uma maior concentração de todos os compostos identificados em relação ao lote normal. O ácido rosmarínico foi o composto mais abundante em ambas as amostras. Em termos de atividade antioxidante ambos os lotes revelaram melhores resultados no ensaio de inibição de peroxidação lipídica (TBARS), seguido dos ensaios de poder redutor e de atividade captadora de radicais DPPH.

Os lotes normais e de reserva de *C. citratus* revelaram perfis fenólicos similares, no que respeita aos compostos detetados, no entanto o lote reserva apresentou concentrações significativamente superiores em comparação com o lote normal. Os flavonoides predominantes em ambos os lotes foram a luteolina-2''-*O*-deoxi-hexosil-6-*C*-glucósido e a luteolina-6-*C*-pentosil-8-*C*-pentósido, mas o composto mais abundante em ambos os lotes foi o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (ácido clorogénico). O lote reserva de *C. citratus* revelou maior atividade antioxidante que o lote normal, com valores EC₅₀ inferiores nos quatro ensaios realizados.

Na espécie *A. citriodora* o lote reserva apresentou concentrações superiores de compostos fenólicos, aos do lote normal, sendo a luteolina-7-*O*-diglucurónido e verbascósido os compostos maioritários em ambos os lotes. Nesta espécie as diferenças entre os resultados obtidos nos quatro ensaios não foram estatisticamente significativos à exceção do ensaio do poder redutor, em que o lote reserva exibiu melhores resultados.

O lote normal de *T. citriodorus* revelou concentrações de compostos fenólicos ligeiramente superiores aos obtidos a partir dos lotes reserva. A luteolina-7-*O*-glucurónido e o ácido rosmarínico foram os compostos mais abundantes em ambos os lotes. Na atividade antioxidante obteve-se um resultado bastante similar, à exceção do poder redutor, no qual o lote normal revelou uma bioatividade superior.



Em relação às correlações elaboradas no presente trabalho, foi possível observar, em geral, que houve uma correlação entre todos os métodos de atividade antioxidante e os compostos fenólicos encontrados em cada uma das amostras analisadas.

Os resultados obtidos no presente estudo realçam a importância das condições de colheita de plantas, demonstrando diferenças na composição de moléculas bioativas de infusões preparadas a partir de diferentes lotes, nomeadamente ácidos fenólicos e flavonoides. A capacidade antioxidante aprimorada nos extratos obtidos a partir do lote de reserva pode ser um ponto importante a considerar durante a seleção do melhor material para preparação de infusões. Deste modo, os resultados obtidos neste estudo permitem aos consumidores fazer uma escolha consciente entre as duas categorias (lotes normais e reserva), não baseando-se apenas no seu valor sensorial, mas também no seu potencial bioativo.

CAPÍTULO V





REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeneye, A. A., & Agbaje, E. (2007). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 440-444.
- Ajayi, E., Sadimenko, A., & Afolayan, A. (2016). GC–MS evaluation of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf oil obtained using modified hydrodistillation and microwave extraction methods. *Food Chemistry*, 209, 262-266.
- Aromáticas, C. d. (2014). *Infusão Bio, lote reserva*. Obtido de Cantinho das Aromáticas: <http://www.cantinhodasaromaticas.pt/loja/infusoes-lote-reserva/pack-natal-4-lotes-reserva/>.
- Arumugam, P., Priya, N., Subathra, M., & Ramesh, A. (2008). Anti-inflammatory activity of four solvent fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* L. investigated on acute and chronic inflammation induced rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26, 92-95.
- Barros, L., Duenas, M., Dias, M., Sousa, M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2013). Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. Infusions. *Food Chemistry*, 136, 1-8.
- Barroso, M., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A., Santos-Buelga, C., Fernandes, I., Barreiro, M.F., Ferreira, I.C.F.R. (2014). Exploring the antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications: Chemical characterization, microencapsulation and incorporation into a moisturizer. *Industrial Crops and Products*, 53, 330-336.
- Barroso, M., Ramalhosa, M., Alves, R., Dias, A., Soares, C., Oliva-Teles, M., & Delerue-Matos, C. (2016). Total antioxidant capacity of plant infusions: Assessment using electrochemical DNA-based biosensor and spectrophotometric methods. *Food Control*, 68, 153-161.
- Benedec, D., Vlase, L., Oniga, I., Mot, A., Silaghi-Dumitrescu, R., Hanganu, D., Tipericiu, C., Crişan, G. (2013). LC-MS analysis and antioxidant activity of



phenolic compounds from two indigenous species of *Mentha*. *Farmacia*, 61(2), 262-267.

- Bensabah, F., Lamiri, A., & Naja, J. (2015). Effect of purified wastewater from the city of Settat (Morocco) on the quality of *Lippia citriodora* essential oil and infusion. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14, 101-108.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.-P., Ravanat, J.-L., & Sauvaigo, S. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research*, 424, 9-21.
- Carnat, A., Carnat, A., Fraisse, D., & Lamaison, J. (1999). The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia*, 70, 44-49.
- Carocho, M., & Ferreira, I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Castroviejo, S. (. (1986-2012). *Flora iberica 1-8, 10-15, 17-18, 21*. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid. Obtido em 23 de Fevereiro de 2017, de Flora Ibérica: <http://www.floraiberica.org/>
- Chan, E., Lim, Y., Chong, K., Tan, J., & Wong, S. (2010). Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 185-189.
- Chatgililoglu, C., & O'Neill, P. (2001). Free radicals associated with DNA damage. *Experimental Gerontology*, 36, 1459-1471.
- Chen, H., Zhang, Q., Wang, X., Yang, J., & Wang, Q. (2011). Qualitative Analysis and simultaneous quantification of phenolic compounds in the aerial Parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-DAD and ESI/MSn. *Phytochemical Analysis*, 22, 247-257.
- Chukwuocha, U., Fernández-Rivera, O., & Legorreta-Herrera, M. (2016). Exploring the antimalarial potential of whole *Cymbopogon citratus* plant therapy. *Journal of Ethnopharmacology*, 193, 517-523.



- Clifford, M., Knight, S., & Kuhnert, N. (2005). Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS(n). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3821-32.
- Costa, G., Grangeia, H., Figueirinha, A., Figueiredo, I., & Batista, M. (2016). Influence of harvest date and material quality on polyphenolic content and antioxidant activity of *Cymbopogon citratus* infusion. *Industrial Crops and Products*, 83, 738-745.
- Crespí, A., & UTAD, J. B. (s.d.). *Aloysia triphylla*. Obtido de Jardim Botânico UTAD: Flora Digital de Portugal: https://jb.utad.pt/especie/aloysia_triphylla
- Crysargyris, A., Nikolaidou, E., Stamatakis, A., & Tzortzakis, N. (2017). Vegetative, physiological, nutritional and antioxidant behavior of spearmint (*Mentha spicata* L.) in response to different nitrogen supply in hydroponics. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plant*, 6, 52-61.
- Diniz, P., Barbosa, M., Milanez, K., Pistonesi, M., & Araújo, M. (2016). Using UV-VIS spectroscopy for simultaneous geographical and varietal classification of tea infusions simulating a home-made tea cup. *Food Chemistry*, 192, 374-379.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(11), 1102-1115.
- Dorman, H., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., & Hiltunen, R. (2003). Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 51, 4563-4569.
- Ekpenyong, C., Akpan, E., & Nyoh, A. (2015). Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(5), 0321-0337.
- El-Hawary, S., Yousif, M., Abdel Motaal, A., & Abd-Hameed, L. (2012). Bioactivities, phenolic compounds and in-vitro propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 50, 1-6.



- Etemad, L., Zafari, R., Moallen, S., Vahdati-Mashhadian, N., Shirvan, Z., & Hosseinzadeh, H. (2016). Teratogenic Effect of Verbascoside, Main Constituent of *Lippia citriodora* Leaves, in Mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 15(2), 521-525.
- FAO, K. (2015). *World tea production and trade current and future development*. Rome: Market and Policy Analyses of Raw Materials, Horticulture and Tropical (RAMHOT) Products Team.
- Fatiha, B., Didier, H., Naima, G., Khodir, M., Martin, K., Léocadie, K., Caroline, S., Mohamed, C., Pierre, D. (2015). Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products* 74, 722–730.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., & Abreu, R. (2009). Antioxidants in Wild Mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1543-1560.
- Fialovaa, S., Veizerova, L., Nosalova, V., Drabikova, K., Tekelova, D., Grancai, D., & Sotnikova, R. (2015). Water Extract of *Mentha x villosa*: Phenolic Fingerprint and Effect on Ischemia-Reperfusion Injury. *Natural Product Communications*, 10, 937-940.
- Fotakis, C., Tsigrimani, D., Tsiaka, T., Z. Lantzouraki, D., F. Strati, I., Makris, C., Tagkouli, D., Proestos, C., Sinanoglou, V., J., Zoumpoulakis, P. (2016). Metabolic and antioxidant profiles of herbal infusions and decoctions. *Food Chemistry*, 211, 963-971.
- Funes, L., Fernández-Arroyo, S., Laporta, O., Roche, E., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Micol, A. (2009). Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. *Food Chemistry*, 117, 589-598.
- García-Cabral, I., & UTAD, J. (s.d.). *Thymus x citriodorus*. Obtido de Jardim Botânico UTAD: Flora Digital de Portugal: https://jb.utad.pt/especie/thymus_x_citriodorus



- Gebicki, J. (2016). Oxidative stress, free radicals and protein peroxides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 595, 33-39.
- Giles, G., Tasker, K., & Jacob, C. (2002). Oxidation of Biological Thiols by Highly Reactive Disulfide-S-Oxides. *General Physiology and Biophysics*, 21, 65-72.
- Godoy, R., Deliza, R., Gheno, L., Licodiedoff, S., Frizon, C., Ribani, R., & Santos, G. (2013). Consumer perceptions, attitudes and acceptance of new and traditional mate tea products. *Food Research International*, 801-807.
- Gomes, A. (Outubro de 2012). Produtividade da cultura de limonete (*Aloysia citriodora* palau): no modo de produção biológica em função de diferentes doses de fertilizantes. *Publindústria*.
- Gramza-Michałowska, A., Kulczyński, B., Xindi, Y., & Gumienna, M. (2016). Research on the effect of culture time on the kombucha tea beverage's antiradical capacity and sensory value. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 15, 447-457.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Tradicional of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1-93.
- Herbals, S. H. (16 de November de 2016). *Herb Spotlight: Lemon Grass (Cymbopogon citratus)*. Obtido de Natural, homeopatic treatments you can grow at home: <http://spirithorseherbals.com/2016/11/16/herb-spotlight-lemon-grass-cymbopogon-citratus/>
- Infante, R., Rubio, P., Contador, L., & Moreno, V. (2010). Effect of drying process on lemon verbena (*Lippia citrodora* Kunth) aroma and infusion sensory quality. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 75-80.
- Inui, T., Okumura, K., Matsui, H., Hosoya, T., & Kumazawa, S. (2017). Effect of harvest time on some in vitro functional properties of hop polyphenols. *Food Chemistry*, 225, 69-76.
- Jiao, J., Gai, Q.-Y., Luo, M., Wang, W., Gu, C.-B., Zhao, C.-J., Zu, I.G., Wei, F.I., Fu, Y.-J. (2013). Comparison of main bioactive compounds in tea infusions with different seasonal *Forsythia suspensa* leaves by liquid chromatography–tandem



- mass spectrometry and evaluation of antioxidant activity. *Food Research International*, 53, 857-863.
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41-60.
- Kato, S., Aoshima, H., Saitoh, Y., & Miwa, N. (2009). Highly hydroxylated or α -cyclodextrin-bicapped water-soluble derivative of fullerene: The antioxidant ability assessed by electron spin resonance method and b-carotene bleaching assay. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 5293-5296.
- Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P., Chanotiya, C., & Dubey, N. (2014). Antifungal, antiaflatoxigenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 89, 29-36.
- Kivilompolo, M., & Hyotylainen, T. (2007). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, 1145, 155-164.
- Lespade, L. (2013). Theoretical design of new very potent free radical scavengers. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1009, 108-114.
- Liu, A., Lin, Y., Yang, M., Guo, H., Guan, S., Sun, J., & Guo, D. (2007). Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1161, 170-182.
- Mandana, B., Rahman, R., Ganjloo, A., Taip, F., Salleh, L., & Sarker, M. (2012). Optimization of Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Bioactive Flavonoid Compounds from Spearmint (*Mentha spicata* L.) Leaves by Using Response Surface Methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 912-920.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I.C.F.R. (2015a). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, 170, 378-85.



- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Silva, S., & Henriques, M., & Ferreira, I.C.F.R. (2015b). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterisation. *Food Chemistry*, *161*, 131-137.
- Mata, A., Proença, C., Ferreira, A., Serralheiro, M., Nogueira, J., & Araújo, M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, *103*, 778-786.
- McDonald, J. (21 de August de 2013). *Will this plant really repel mosquitos? Cymbopogon citratus*. Obtido de Botanical musings: <http://botanicalmusings.blogspot.pt/2013/08/will-this-plant-really-repel-mosquitos.html>
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, *130*, 1036-1043.
- Moldovan, R., Oprean, R., Benedec, D., Hanganu, D., Duma, M., Oniga, I., & Vlase, L. (2014). LC-MS analysis, antioxidant and antimicrobial activities for five species of mentha cultivated in romania. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, *9*, 559-566.
- Naik, M., Fomda, B., Jaykumar, E., & Bhat, J. (2010). Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 535-538.
- Negrelle, R., & Gomes, E. (2007). *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf : chemical composition and biological activities. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*, *9*(1), 80-92.
- Niki, E. (2016). Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *595*, 19-24.
- Oakeley, H. (s.d.). *Mentha spicata L*. Obtido de The Royal College of Physicians: Garden of Medicinal Plants: <http://garden.rcplondon.ac.uk>



- Omidbaigi, R., Sefidkon, F., & Hejazi, M. (2005). Essential oil composition of *Thymus x citriodorus* L. cultivated in Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 237-238.
- Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.
- Pereira, C., Barros, L., & Ferreira, I.C.F.R. (2015). A comparison of the nutritional contribution of thirty-nine aromatic plants used as condiments ad/or herbal infusions. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70, 176-183.
- Pereira, E., Barros, L., Antonio, A., Cabo Verde, S., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2016a). Infusions from *Thymus vulgaris* L. treated at different gamma radiation doses: Effects on antioxidant activity and phenolic composition. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 34-39.
- Pereira, E., Barros, L., Antonio, A., Cabo Verde, S., Santos-Buelga, C., Ferreira, I., & Rodrigues, P. (2017a). Is gamma radiation suitable to preserve phenolic compounds and to decontaminate mycotoxins in aromatic plants? A case-study with *Aloysia citrodora*. *Molecules*, 22, 347-359.
- Pereira, E., Pimenta, A., Calhelha, R., Antonio, A., Barros, L., Santos-Buelga, C., . . . Ferreira, I.C.F.R. (2017b). Infusions of gamma irradiated *Aloysia citrodora* L. and *Mentha x piperita* L.: Effects on phenolic composition, cytotoxicity, antibacterial and virucidal activities. *Industrial Crops and Products*, 97, 582-590.
- Pereira, E., Pimenta, A., Calhelha, R., Antonio, A., Verde, S., Barros, L., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. (2016b). Effects of gamma irradiation on cytotoxicity and phenolic compounds of *Thymus vulgaris* L. and *Mentha x piperita* L.. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 370-377.
- Pereira, O., Macias, R., Perez, M., Marin, J., & Cardoso, S. (2013). Protective effects of phenolic constituents from *Cytisus multiflorus*, *Lamium album* L. and *Thymus citriodorus* on liver cells. *Journal of functional foods*, 5, 1170-1179.
- Pereira, O., Peres, A., Silva, A., Domingues, M., & Cardoso, S. (2013). Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x*



citriodorus using a validated HPLC–UV and ESI–MS combined method. *Food Research International*, 54, 1773-1780.

Pires M.S., C., Martins, N., Carvalho, A., Barros, L., & Ferreira, I.C.F.R. (2016). Phytopharmacologic preparations as predictors of plant bioactivity: A particular approach to *Echinacea purpurea* (L.) Moench antioxidant properties. *Nutrition*, 32, 834-839.

Pisoschi, A., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.

Plants, L. H. (s.d.). *Mint 'Native' spearmint (Mentha spicata)*. Obtido de Log House Plants: <https://loghouseplants.com/plants/shop/mint-native-spearmint-mentha-spicata/>

Port's, P., Chisté, R., Godoy, H., & Prado, M. (2013). The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. *Food Research International*, 53, 875-881.

Quirantes-Piné, R., Herranz-López, M., Funes, L., & Borrás-Linares, I. (2013). Phenylpropanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of *Lippia citriodora* in rats. *Phytomedicine*, 20, 1112-1118.

Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1995). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(7), 933-956.

Rita, I., Pereira, C., Barros, L., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2016). *Mentha spicata* L. infusions as sources of antioxidant phenolic compounds: emerging reserve lots with special harvest requirements. *Food & Function*, 7, 4188-4192.

Roriz, C., Barros, L., Carvalho, A., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2014). *Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A phytochemical study focused on antioxidant compounds. *Food Research International*, 62, 684–693.



- Royal Botanic Gardens, K. (s.d.). *Cymbopogon citratus* (lemon grass). Obtido de Kew: Royal Botanic Gardens: <http://www.kew.org/science-conservation/plants-fungi/cymbopogon-citratus-lemon-grass>
- Ruan, M., Li, Y., Li, X., Luo, J., & Kong, L. (2012). Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medicinal preparation Guan-Xin-Ning injection by HPLC–DAD–ESI–MSn. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 59, 184-189.
- Sarma, R., & Medhi, C. (2006). Structures and stabilities of sugar radical nucleotides. *Journal of Molecular Structure*, 763, 51-57.
- Scherer, R., Lemos, M., Lemos, M., Martinelli, G., Martins, J., & da Silva, A. (2013). Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products*, 50, 408-413.
- Schmidt, A., Bischof-Deichnik, C., & Stahl-Biskup, E. (2004). Essential oil polymorphism of *Thymus praecox* subsp. *arcticus* on the British Isles. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 409-421.
- Schulzki, G., Nublein, B., & Sievers, H. (2017). Transition rates of selected metals determined in various types of teas (*Camelia sinensis* L. Kuntze) and herbal/fruit infusions. *Food Chemistry*, 215, 22-30.
- Sharma, O., & Bhat, T. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113, 1202-1205.
- Soonwera, M., & Phasomkusolsil, S. (2015). Efficacy of Thai herbal essential oils as green repellent against mosquito vectors. *Acta Tropica*, 142, 127-130.
- Soul, O. (22 de July de 2011). *Cymbopogon citratus* leaves. Obtido de Wikimedia Commons, the free media repository: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cymbopogon_citratus_leaves.jpg
- UTAD, J. B. (s.d.). *Mentha spicata* L. Obtido de Jardim Botânico UTAD: Flora Digital de Portugal: https://jb.utad.pt/especie/mentha_spicata



Wenjiao, F., Yongkui, Z., Yunchuan, C., Junxiu, S., & Yuwen, Y. (2014). TBARS predictive models of pork sausages stored at different temperatures. *Meat Science*, 96, 1-4.

Wollinger, A., Perrin, É., Chahboun, J., Jeannot, V., Touraud, D., & Kunz, W. (2016). Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. *Comptes Rendus Chimie*, 19, 754-765.